

Aus der Anatomischen Anstalt, Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Herstellung von Antikörpern gegen ADAM12 mittels Chicken Antibody Phage Display

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johann Ahn

aus
Daejon

2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Sebastian Kobold

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Juli 2015

Meiner Familie in großer Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank gilt mein besonderer Dank für die Betreuung meiner Promotion und für die langjährige Unterstützung und Geduld bei der Erstellung dieses Manuskripts.

Prof. Dr. med. Christoph Schmitz danke ich für die Übernahme der Betreuung an der LMU München.

Prof. Dr. med. Peter Kaufmann danke ich für seine Unterstützung und promotionsbegleitenden Ratschläge. Die gute zwischenmenschliche Atmosphäre und der wissenschaftliche Austausch am ehemaligen Institut für Anatomie II der RWTH Aachen hat wesentlich zur Erstellung dieser Promotion beigetragen.

Für die fachliche Mitbetreuung im Labor danke ich Dr. Ulrike Schmitz und Dr. Andy Pötgens, für die praktische Unterstützung im Labor danke ich Evi Milz, Angela Rüben und Uta Zahn.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die ADAM Metalloproteinasen	1
1.2	ADAM12	3
1.2.1	Struktur und Funktion	3
1.2.2	Pathophysiologische Targets	5
1.2.3	Bedeutung in der Klinik	7
1.2.4	ADAM12 in der Placenta	8
1.3	Chicken Antibody Phage Display	9
1.4	Aufgabenstellung	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits	12
2.1.1.1	Chemikalien	12
2.1.1.2	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.1.3	Kits	14
2.1.2	Versuchstiere	15
2.1.3	Peptide, Plasmide und Primer	15
2.1.3.1	ADAM12 Peptide	15
2.1.3.2	Phagemidvektor pComb3HSS	16
2.1.4	Primer	18
2.1.5	Enzyme	19
2.1.6	Bioorganismen	20
2.1.6.1	E. coli-Stämme	20
2.1.6.2	Helferphage M13KO7	21
2.1.7	Antikörper	22
2.1.8	Puffer, Lösungen und Medien	23
2.1.9	Geräteliste	25
2.2	Methoden	27
2.2.1	Genehmigung der gentechnischen Arbeiten S1	27
2.2.2	Herstellung der Phagenbibliothek	27
2.2.2.1	Immunisierung der Hühner und Isolierung der Gesamt-RNA	27
2.2.2.2	Generierung und Amplifikation der cDNA	28
2.2.2.3	Splice-Overlap-Extension PCR und Klonierung in den Vektor	31
2.2.2.4	Transformation in E. coli und Herstellung der Phagenbibliotheken	34
2.2.3	Anzucht des M13-Helferphagen	36

2.2.4	Phage Display	37
2.2.4.1	Panning der scFv-Bibliothek gegen ADAM12-Peptide	37
2.2.4.2	Phagenaufzucht und –ernte	37
2.2.4.3	Titration der Phagenbibliothek	39
2.2.4.4	Plasmidpräparation des Phagenplasmids	39
2.2.5	Evaluation der Phagenantikörper	40
2.2.5.1	Phagen-ELISA	40
2.2.5.2	Sequenzanalyse und Charakterisierung	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Herstellung der Phagenbibliothek	42
3.1.1	Immunisierung der Hühner und Isolierung der Gesamt-RNA	42
3.1.2	Generierung und Amplifikation der cDNA	42
3.1.3	Splice-Overlap-Extension PCR und Klonierung in den Vektor	44
3.1.4	Transformation in E. coli und Herstellung der PDLs	48
3.2	Phage Display	50
3.3	Evaluation der Phagenantikörper	52
3.3.1	Phagen-ELISA	52
3.3.2	Sequenzanalyse und Charakterisierung	53
4	Diskussion	57
4.1	Charakterisierung der ADAM12-Peptidsequenz 2800	57
4.2	Charakterisierung der Antikörper gegen 2800	59
4.3	Herstellung der scFv-Antikörper mittels Phage Display	61
4.4	Weitere Schritte	64
5	Zusammenfassung	66
6	Literatur	68
7	Abkürzungsverzeichnis	74

1 Einleitung

1.1 Die ADAM Metalloproteinasen

Die Familie der ADAMs (ADAM - Kurzform für A Disintegrin And Metalloproteinase) sind eine Familie multifunktionaler Proteine, die sowohl in löslicher als auch in membranständiger Form vorkommen. Sie gehören mit den Schlangengift-Metalloproteinasen (SVMP – Snake Venom Metalloproteinasen) zu der Familie der Zink-Metalloproteinasen (Edwards, Handsley et al. 2008). ADAMs besitzen typische funktionelle Domänen (Abbildung 1): eine Prodomäne, eine Metalloproteinase-Domäne, eine Disintegrin-ähnliche Domäne, eine zysteinreiche Region und eine EGF-ähnliche Domäne. Darüber hinaus finden sich bei membrangebundenen ADAMs eine Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne (Duffy, McKiernan et al. 2009).

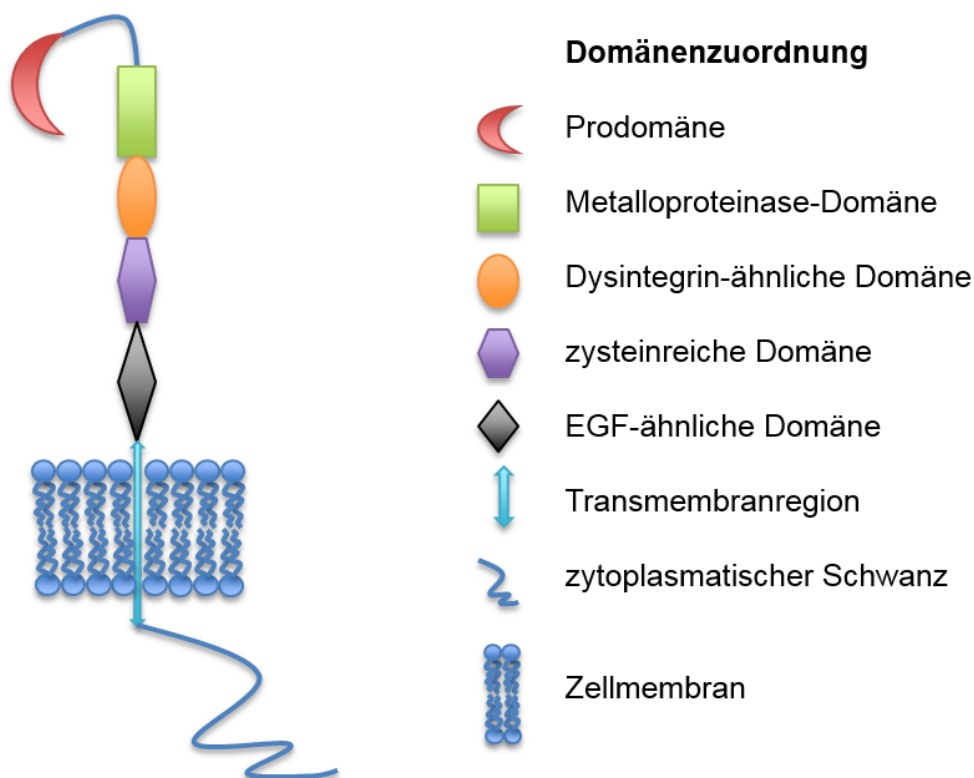


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines prototypischen ADAMs (modifiziert nach Nyren-Erickson, Jones et al. 2013)

Die ersten Vertreter der ADAMs wurden als Spermien-assoziierte Proteine entdeckt (Blobel 1997). Seitdem hat sich das Wissen um die Mitglieder dieser Proteinfamilie

kontinuierlich erweitert. Mittlerweile sind 40 ADAMs bekannt, von denen 21 im Menschen Funktionen aufweisen (Duffy, McKiernan et al. 2009).

Die Funktionen der ADAMs sind vielfältig. Sie spielen wichtige physiologische Rollen bei Zelladhäsion, Zellmigration, Proteolyse und in Signalkaskaden (Edwards, Handsley et al. 2008). Am besten untersucht ist ihre proteolytische Abspaltung und Freisetzung von biologisch wichtigen Liganden (Duffy, McKiernan et al. 2009). Alle ADAMs weisen zwar eine entsprechende Metalloproteinase-Domäne auf, aber nur bei 13 der 21 im Menschen bekannten ADAMs ist diese im sogenannten „Ectodomain-Shedding“ diverser Wachstumsfaktoren, Zytokine, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle tatsächlich funktionsfähig (Edwards, Handsley et al. 2008, Reiss und Saftig 2009). ADAMs werden in dieser Funktion auch als Sheddase bezeichnet. Für die acht ADAMs ohne funktionsfähige Metalloproteinase scheint eine Protein-Protein-Interaktion Grundlage ihrer biologischen Funktion zu sein (Edwards, Handsley et al. 2008).

Gut untersuchte und beispielhafte Vertreter der ADAMs sind ADAM17 und ADAM10. Als TACE - TNF α (Tumor Necrosis Factor Alpha) Convertase - ist ADAM17 die Hauptprotease für die Aktivierung von pro-TNF- α und beeinflusst damit entscheidend Immun- und Entzündungsreaktionen (Blobel 2005). Darüber hinaus wird ADAM17 als Sheddase bei der Generierung aktiver Formen von EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)-Liganden benötigt und ist für die Entwicklung epidermaler Gewebe von essentieller Bedeutung (Blobel 2005). Neben ADAM17 haben auch andere Vertreter der ADAMs in bestimmten Gewebekontexten wichtige Sheddase-Funktionen (Edwards, Handsley et al. 2008). Ein weiterer Vertreter der ADAMs ist ADAM10 als Hauptvermittler in den Notch- und Eph/Ephrin-Signalwegen (Hartmann, de Strooper et al. 2002, Janes, Saha et al. 2005), die wichtige Funktionen in der Zell-Zell-Kommunikation haben.

Die Familie der ADAMs spielt elementare Rollen bei Entwicklungsprozessen und der Homöostase, so dass nicht verwundert, dass eine Dysregulation ihrer Funktion mit verschiedenen pathologischen Zuständen in Verbindung gebracht wird: unter anderem Karzinomen, kardiovaskulären Erkrankungen, Asthma und der Alzheimer-Demenz (Edwards, Handsley et al. 2008).

1.2 ADAM12

1.2.1 Struktur und Funktion

ADAM12 ist ein proteolytisch aktives Mitglied der ADAM-Familie (Loechel, Gilpin et al. 1998). Zusätzlich zu der membranverankerten Form, die als ADAM12-L bezeichnet wird, kommt eine alternative Spliceform vor, die sezerniert wird: ADAM12-S (Gilpin, Loechel et al. 1998, Loechel, Gilpin et al. 1998). Letzterer fehlen Transmembran-Domäne und zytoplasmatischer Schwanz (Abbildung 2).

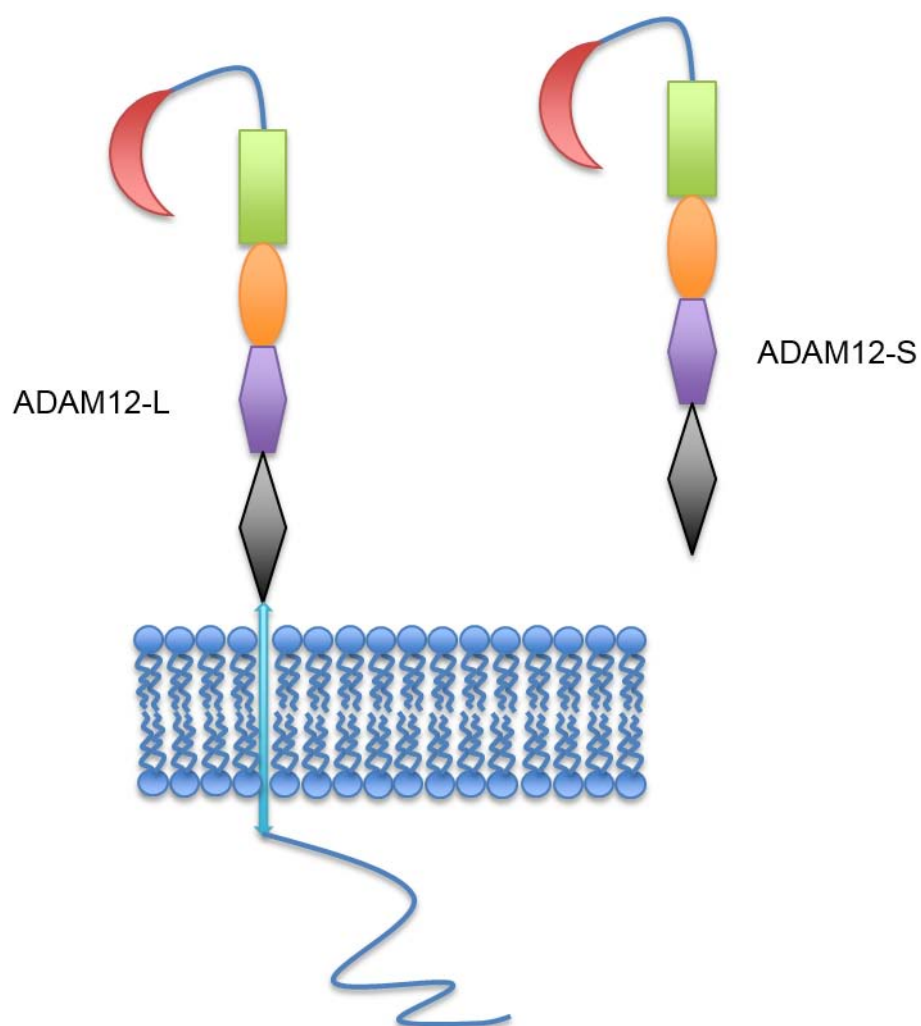


Abbildung 2: Struktur der ADAM12-L und -S Form (modifiziert nach Nyren-Erickson, Jones et al. 2013)

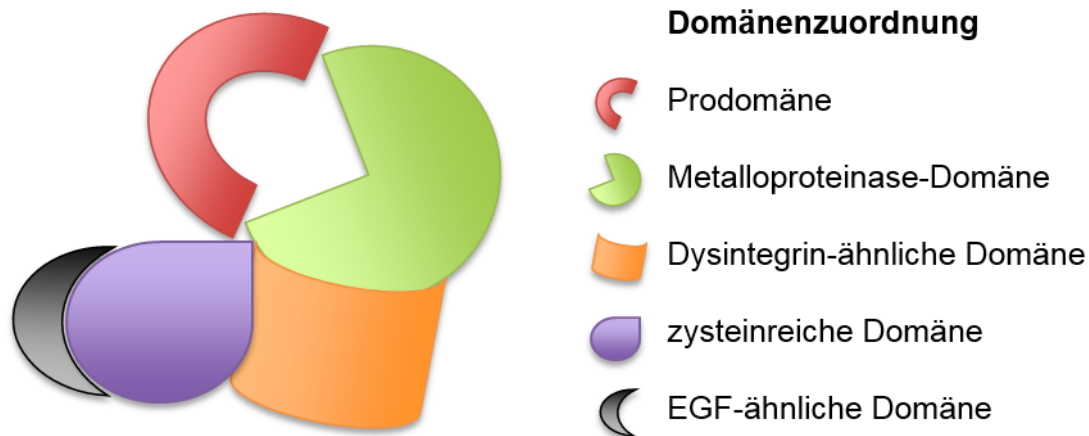


Abbildung 3: Schematische Darstellung der ADAM12-S Struktur anhand elektronenmikroskopischer Daten (modifiziert nach Wewer, Morgelin et al. 2006, Nyren-Erickson, Jones et al. 2013)

Die vollständige dreidimensionale Struktur von ADAM12 ist nicht bekannt, Wewer et al. (2006) haben jedoch die grobe Struktur von ADAM12-S elektronenmikroskopisch untersucht und aufgedeckt: die Daten lassen das Gesamtprotein als „kompaktes Kleeblatt“ erscheinen, das aus vier rundlichen Domänen besteht (Wewer, Morgelin et al. 2006) (Abbildung 3). In einer weiteren Arbeit teilen Jacobsen und Wewer (2009) ADAM12-L nach putativer Funktion in drei Abschnitte ein: Kopf, Körper und Schwanz. Der Kopf (bestehend aus Pro- und Metalloproteinase-Domäne) vermittelt die Bearbeitung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Der Körper des Proteins (bestehend aus Disintegrin-, zysteinreicher und EGF-ähnlicher Domäne) ist beteiligt am Kontakt mit der extrazellulären Matrix und anderen Zellen durch die Interaktion mit Integrinen und Syndekanen. Der Schwanz (bestehend aus der zytoplasmatischen Domäne) dient schließlich der Interaktion mit intrazellulären Signalmolekülen (Jacobsen und Wewer 2009).

ADAM12 wird vor allem in Knorpel, Knochen, Muskel, Fettgewebe, Leber, Uterus und Nervengewebe (Nyren-Erickson, Jones et al. 2013) exprimiert. ADAM12 agiert in diesen Geweben vor allem bei der Zelladhäsion und –fusion, dem Umbau der extrazellulären Matrix und den zellulären Signalwegen (Tabelle 1).

Tabelle 1 **Rolle von ADAM12 in gesundem Gewebe (Nyren-Erickson, Jones et al. 2013)**

Gewebe	Rolle
Knorpel	<ul style="list-style-type: none"> • Modulation der Chondrozytenproliferation
Knochen	<ul style="list-style-type: none"> • Knochenverlängerung durch proteolytische Modifikation der Zell-Matrix-Interaktion • Bildung der Osteoklasten aus Monozyten
Muskel	<ul style="list-style-type: none"> • Formation eines Reservezellpools durch Zell-Zell-Interaktion • Induktion einer Quieszenz während der Myozytendifferenzierung
Fett	<ul style="list-style-type: none"> • Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts • Reduktion der Zelladhäsion • Eingeschränkte Funktion des $\beta 1$-Integrin
Leber	<ul style="list-style-type: none"> • Remodelling der extrazellulären Matrix während der Fibrogenese
Uterus	<ul style="list-style-type: none"> • Dezidualisierung während der frühen Schwangerschaftsphasen
Gehirn	nicht bekannt

ADAM12 ist an der Myoblastenfusion beteiligt und hat damit potentiell eine wichtige Funktion in der Myogenese (Yagami-Hiromasa, Sato et al. 1995, Gilpin, Loechel et al. 1998). Die Bindung an die Myoblasten erfolgt dabei über die Disintegrin-ähnliche und zysteinreiche Domäne. Darüber hinaus konnten Iba et al. (1999) eine Bindung von ADAM12 an primäre murine Osteoblasten, fibroblastische, osteoblastische und myoblastische Zellen nachweisen. ADAM12 kann als aktive Metalloproteinase verschiedene extrazelluläre Matrixproteine verarbeiten, so dass eine Beteiligung von ADAM12 an Gewebewachstum und –umbau gut herzuleiten ist (Nyren-Erickson, Jones et al. 2013).

Auf eine Rolle von ADAM12 in der Zellmigration weisen Untersuchungen hin, die zeigen, dass eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelte Relokalisation von ADAM12-L von der perinukleären Region in die Zellperipherie einen Wechsel des Zellphänotyps in eine hochmotile Form bewirkt (Ray, Dhar et al. 2011, Nyren-Erickson, Jones et al. 2013).

1.2.2 Pathophysiologische Targets

Growth Factor Receptor Tyrosinkinasen (GF RTK) sind eine Rezeptorproteinfamilie, die intrazelluläre Signalwege vermittelt, die in Krankheiten häufig gestört werden

(Nyren-Erickson, Jones et al. 2013). ADAM12 ist an verschiedenen pathologischen Veränderungen von GF RTK-Signalketten beteiligt, was sich in vielfältigen Krankheitsbildern manifestieren kann (Higashiyama und Nanba 2005, Li, Duhachek-Muggy et al. 2012).

Ein Beispiel ist die Störung der Signalkaskade des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), einer prototypischen GF RTK. Die EGFR-Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung und –proliferation, wird jedoch auch in Verbindung gebracht mit pathologischen Prozessen wie der Begünstigung verschiedener Tumore aus epidermalem Gewebe (Yarden und Sliwkowski 2001). Liganden zur Aktivierung des EGFR und der nachfolgenden Signalkaskaden werden als transmembrane Präkursoren synthetisiert. Membrangebundene EGFR-Liganden haben nur eine begrenzte biologische Aktivität. Um ihre volle Funktionalität zu erreichen, müssen sie durch Ectodomain-Shedding abgetrennt werden. ADAM12 reguliert über das Ectodomain-Shedding die Bereitstellung von löslichen Wachstumsfaktoren (Higashiyama und Nanba 2005). HB-EGF (Heparin-binding EGF-like Growth Factor) ist ein bekannter EGFR-Ligand und ADAM12-Substrat und wird so mit einer EGFR-Dysregulation in Verbindung gebracht (Higashiyama und Nanba 2005).

Her2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)/neu ist ein anderer Vertreter der GF RTK-Familie. Her2/neu hat keinen natürlichen Liganden, kann jedoch mit anderen GF RTKs heterodimerisieren (Olayioye 2001). Bei bestimmten Tumoren, vor allem dem Mammakarzinom, ist das Vorhandensein von Her2/neu in der Klinik ein wichtiger prognostischer Marker und Grundlage für Therapieentscheidungen. Er ist aber auch selbst ein wichtiges Ziel von sogenannten „Targeted Therapies“ (zielgerichteten Therapien) bei Tumoren, die Her2/neu überexprimieren (Klement, Goukassian et al. 2012). ADAM12 spielt eine wichtige Rolle in der Expression von Her2/neu an der Zelloberfläche von malignen Zellen und kann die Dichte von Her2/neu hochregulieren (Roy und Moses 2012). Es besteht zudem eine positive Feedbackschleife für die ADAM12-Expression bei erhöhter Her2-Präsenz (Roy und Moses 2012).

Aktuelle „Targeted Therapies“ zielen darauf ab, die Her2/neu-Aktivität und Rezeptorexpression zu reduzieren. Der humanisierte monoklonale Antikörper

Trastuzumab bindet an den Her2/neu-Rezeptor, der auf malignen Zellen überexprimiert wird. Diese Strategie hemmt das Wachstum bei einigen Tumoren, geht jedoch mit einer Reihe von schwerwiegenden Nebenwirkungen (z.B. signifikanter Kardiotoxizität) einher (Guglin, Cutro et al. 2008). Die Regulation der ADAM12-Aktivität könnte ein weniger toxischer alternativer Angriffspunkt auf die Her2-Signalkaskade sein (Nyren-Erickson, Jones et al. 2013).

1.2.3 Bedeutung in der Klinik

Bei verschiedenen Krankheiten korrelieren quantitative ADAM12-Expressionslevel mit Progression und Prognose. Darunter fallen verschiedenste Tumorentitäten (Roy, Wewer et al. 2004, Frohlich, Albrechtsen et al. 2006, Rocks, Paulissen et al. 2006, Rocks, Estrella et al. 2008, Mino, Miyahara et al. 2009, Roy, Yang et al. 2009, Frohlich, Nehammer et al. 2011, Narita, Seclaman et al. 2012, Roy und Moses 2012), Leberfibrose (Bourd-Boittin, Le Pabic et al. 2008), kardiale Hypertrophie (Wang, Chow et al. 2009) und Asthma (Estrella, Rocks et al. 2009).

Am besten untersucht ist die Rolle von ADAM12 beim Brustkrebs. ADAM12-S ist bei Mammakarzinompatienten ein diagnostischer Marker im Urin und korreliert gut mit der Anwesenheit des Malignoms und dem Stadium der Erkrankung (Roy, Wewer et al. 2004). Die ADAM12-S-Expression und die Konzentration im Urin steigen mit fortschreitender Erkrankung. Ein wichtiges pathophysiologisches Merkmal von ADAM12-überexprimierenden Mammakarzinomzellen ist die Unabhängigkeit von der Östrogenstimulation (Roy und Moses 2012). ADAM12-L und ADAM12-S fördern dabei die Östrogenunabhängigkeit über unterschiedliche Wege: ADAM12-L vermutlich über eine erhöhte EGFR-Expression und MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase)-Aktivierung, ADAM12-S durch eine Verstärkung der IGF-1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor)-Signalkaskade (Roy und Moses 2012). Die Expression beider Isoformen wird unter Tamoxifen, einem häufig therapeutisch eingesetzten Antiöstrogen, stark erhöht und könnte auf diesem Weg eine Resistenz gegen die antiöstrogene Therapie fördern (Roy und Moses 2012).

Von besonderem Interesse ist die Bestimmung von ADAM12 während der Schwangerschaft. Vielversprechende Forschungsbemühungen zielten auf die Anwendung von ADAM12 als Biomarker zur Detektion des Down-Syndroms und als

Marker für Präeklampsie hin. Allerdings waren die Ergebnisse für beide Anwendungen widersprüchlich. Laigaard et al. (2006) zeigten zunächst eine Korrelation von signifikant reduzierten ADAM12-Werten im Blut schwangerer Frauen im ersten Trimester mit der Geburt von Kindern mit Down-Syndrom (Laigaard, Spencer et al. 2006). Dieser Befund wurde jedoch von Poon et al. (2009) in Frage gestellt, die keine Unterschiede in den ADAM12-Leveln bei Schwangeren mit Down-Syndrom-Kindern und solchen mit gesunden Kindern nachweisen konnten (Poon, Chelemen et al. 2009). Messungen im zweiten Trimester scheinen eine zuverlässigere Korrelation und Vorhersage zu erlauben (Christiansen, Spencer et al. 2007, Wang, Lu et al. 2010). Die ADAM12-Messung ist jedoch unter den derzeitigen Umständen nicht kosteneffektiv (Christiansen, Pihl et al. 2010) und hat sich aufgrund der widersprüchlichen Datenlage nicht durchgesetzt.

1.2.4 ADAM12 in der Placenta

Während die Rolle von ADAM12 in pathologischen Prozessen vielfach untersucht wurde, ist die physiologische Funktion von ADAM12 in normalen Entwicklungsprozessen, bei denen Migration, Invasion und Fusion von Zellen eine Rolle spielen, bislang vergleichsweise weniger gut verstanden.

Die epitheliale Barriere der menschlichen Placenta entsteht aus den Trophoblasten der Blastozyste über Migrations-, Invasions- und Fusionsprozesse (Boyd und Hamilton 1970). ADAM12 wird in der menschlichen Placenta überexprimiert und immunolokalisiert vor allem in villösen Zytotrophoblasten und multinukleären Synzytiotrophoblasten (Kokozidou, Drewlo et al. 2011). Eine aktuelle Arbeit von Aghababaei et al. (2014) zeigte, dass vor allem ADAM12-S, über ihre intrinsische katalytische Aktivität in Trophoblasten die Zellmigration, -invasion und -säulenformierung fördert. Unklar blieb die genaue Funktion der Splicevariante ADAM12-L, welche ebenfalls in der Placenta exprimiert wird, jedoch die Invasivität nicht zu beeinflussen scheint.

Ein wichtiges Ereignis zu Beginn der Schwangerschaft ist die Fusion von Trophoblasten zu einem Synzytiotrophoblasten (Potgens, Schmitz et al. 2002). Der Synzytiotrophoblast bildet eine epitheliale Struktur, welche die wichtigste maternal-fetale Barriere ist (Boyd und Hamilton 1970). Da ADAM12 im menschlichen Körper

auch bei anderen Beispielen der Formierung von Synzytien eine Rolle spielt – der Myoblastenfusion zu Skellettmuskelfasern (Gilpin, Loechel et al. 1998) und der Osteoklastenfusion (Abe, Mocharla et al. 1999) – ist die Hypothese naheliegend, dass auch die Bildung des Synzytiotrophoblasten durch ADAM12 beeinflusst wird (Potgens, Schmitz et al. 2002).

1.3 *Chicken Antibody Phage Display*

Mitte der 1980er Jahre wurde das Phage Display als eine Kombination von molekularbiologischen Methoden zur Präsentation („Display“) von Peptiden auf filamentösen Bakteriophagen („Phage“) entwickelt (Smith 1985). Die Methode wurde weiterentwickelt zum Antibody Phage Display mit der Präsentation von monoklonalen Antikörpern auf dem Bakteriophagen (McCafferty, Griffiths et al. 1990, Barbas, Kang et al. 1991, Clackson, Hoogenboom et al. 1991, McCafferty, Fitzgerald et al. 1994, Sheets, Amersdorfer et al. 1998). Dadurch ist das Phage Display ein hilfreiches Werkzeug in der Herstellung von monoklonalen Antikörpern und eine Alternative zur konventionellen Hybridom-Technik (Kohler und Milstein 1975) geworden.

Das Chicken Antibody Phage Display ist eine Methode, die von Andris-Widhopf et al. (2000) entwickelt wurde und modifiziert in dieser Arbeit zum Einsatz kam. Dabei werden Hühner, statt wie üblich Nager oder andere Säugetiere, als Wirtstiere immunisiert. Der Vorteil ist, dass ein hochkonserviertes Säugetier-Antigen in einem Huhn mit höherer Wahrscheinlichkeit eine stärkere Immunantwort hervorrufen kann als in einem Säugetier (Song, Yu et al. 1985, Goueli, Hanten et al. 1990).

Kurz zusammengefasst beinhaltet das Chicken Antibody Phage Display folgende Schritte (Andris-Widhopf, Rader et al. 2000): Nach Immunisierung eines Huhns werden die Lymphozyten aus seiner Milz isoliert. Die RNA der Lymphozyten wird präpariert und durch reverse Transkription in cDNA überführt. Die für die variablen Regionen der Immunglobuline kodierenden cDNA-Abschnitte werden amplifiziert. Über eine Splice-Extension-Overlap PCR werden die leichten (Vk) und schweren (Vh) Ketten der variablen Regionen zufällig kombiniert und mit einer gemeinsamen Linkersequenz zu einem vollständigen Single-chain variable Fragment (scFv) konstruiert (Abbildung 4). Die resultierende DNA („Insert“) wird nach Restriktionsverdau der *Sfi* I-Restriktionsstellen in einen pComb3-Phagemidvektor

ligiert. Das Ligationsprodukt wird in *E. coli* eingebracht. Werden diese *E. coli* mit dem filamentösen M13-Bakteriophagen, dem „Helferphagen“ (Vieira und Messing 1987), infiziert, können die Bakterien einen rekombinanten Bakteriophagen assemblieren und freisetzen. Das Ligationsprodukt kodiert dabei für ein Fusionsprotein aus dem Hüllprotein pIII des M13-Phagen und dem scFv-Antikörper. Die Information für die übrigen zur Phagenassemblierung benötigten Hüllproteine wird durch die Superinfektion mit dem Helferphagen geliefert, so dass ein rekombinanter Phage assembliert und freigesetzt wird, der die Pagemidvektor-DNA in sich trägt und auf seiner Oberfläche den scFv-Antikörper präsentiert. Die entstandenen „Phagenantikörper“ können nun gegen ein Antigen selektiert und angereichert werden, während unspezifische Phagenantikörper durch Waschen entfernt werden. Durch die Wiederholung der Selektion, die als „Panning“ bezeichnet wird, ist es möglich, spezifische Antikörper mit hoher Bindungsaffinität anzureichern.

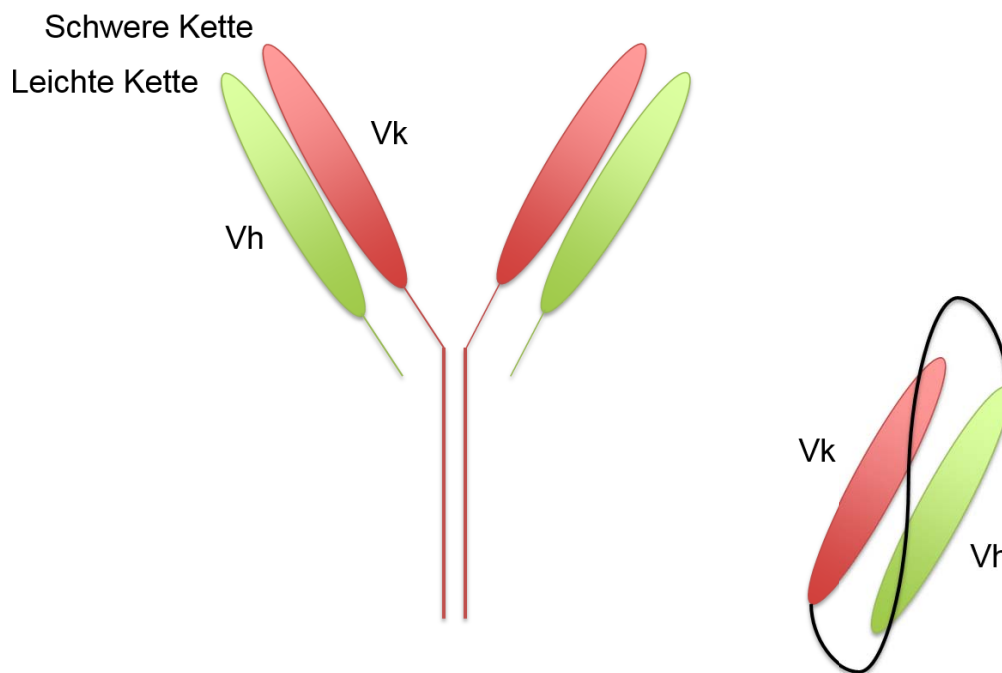


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines konventionellen Antikörpers und eines Single-chain fragment variable (scFv)-Antikörpers mit den korrespondierenden Untereinheiten.

1.4 Aufgabenstellung

Die vorgelegte Arbeit entstand in einer Arbeitsgruppe, die sich mit der Invasivität und der synzytialen Fusion von Trophoblasten beschäftigte. Dabei lag ein besonderer Schwerpunkt auf der Identifizierung fusionshemmender Antikörper. Rekombinante

Antikörper mit Subspezifität für Trophoblast-Membranproteine bzw. für fusogene Membranproteine wurden dafür mittels Phage Display aus dem Immunrepertoire mit Trophoblast-immunisierten Hühnern generiert und mittels selektivem Panning isoliert. Nach löslicher Expression in *E. coli* bzw. in Hefekulturen wurden sie bezüglich ihrer Interaktion mit dem synzytialen Fusionsprozess der Trophoblasten untersucht.

ADAM12 bot sich aufgrund seiner Überexpression in der Placenta und den Trophoblasten (Kokozidou, Drewlo et al. 2011), der bekannten Beteiligung an der Myoblasten- und Osteoklastenfusion (Yagami-Hiromasa, Sato et al. 1995, Iba, Albrechtsen et al. 1999) und seiner Rolle beim Auf- und Umbau von Geweben (Nyren-Erickson, Jones et al. 2013) als attraktiver Kandidat zur Testung bezüglich seiner Funktion in der Trophoblastenfusion an.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass Antikörper gegen ADAM12 mittels Chicken Antibody Phage Display generiert werden können, um in Anschlussarbeiten weitere Antikörper zu generieren und Erkenntnisse zur Lokalisierung und Funktion bei plazentären Fusionsprozessen zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits

Alle verwendeten Chemikalien, Kits und Fertiglösungen entsprachen mindestens der Reinheitsstufe p.A.

2.1.1.1 Chemikalien

Es wurden Feinchemikalien und Materialien (Tabelle 2) für das Biochemie-Labor von folgenden Firmen bezogen:

- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (Carl Roth)
- Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland (Biomol)
- GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden (GE Healthcare)
- Life Technologies, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (Life Technologies)
- Linde AG, Pullach, Deutschland (Linde)
- Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (Merck)
- Promega GmbH, Mannheim, Deutschland (Promega)
- Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland (Roche)
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland (Sigma-Aldrich)

Tabelle 2 Übersicht über die verwendeten Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Agar	Merck
Agarose	Roche
Agarosegel	Promega
Antibiotika	Life Technologies
Bidestilliertes Wasser, PCR-grade	Roche
BSA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Carl Roth
Flüssigstickstoff	Linde
Glycin	Merck
HCl	Merck
Hefeextrakt	Merck
KCl	Merck
LiCl	Merck
MgCl ₂	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
Nuklease-freies Wasser	Promega
OPD	Sigma-Aldrich
PBS	Merck
Pepton	Merck
PEG 8000	Sigma-Aldrich
PIC	Roche
RNase-Inhibitor	Roche
Tris	Merck
Trypton	Merck
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien (Tabelle 3) stammten von folgenden Firmen:

- BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland (BD Becton)
- Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland (Eppendorf)
- Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland (Greiner)
- Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (Merck)
- Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland (Miltenyi)
- Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (Thermo Fisher)
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland (Sigma-Aldrich)
- Steffens Biotechnische Analysen GmbH, Ebringen, Deutschland (Steffens)

Tabelle 3 **Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cryo-Röhrchen (zentrifugenresistent)	BD Becton
EIA-Platten (Streptavidin-beschichtet)	Thermo Fisher
EIA-Platten (Streptavidin-beschichtet)	Steffens
Falcon Zentrifugenröhrchen	BD Becton
Membranfilter	Thermo Fisher
µMACS Säulen mit zugehörigem Puffer (Protein Application), Streptavidin-MicroBeads	Miltenyi
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf
Safe-Lock Tube Reaktionsgefäße	Eppendorf
Spectrophotometerküvetten	Sigma-Aldrich
Ultrafree MC Reaktionsgefäße	Merck

2.1.1.3 Kits

Kits zur RNA/DNA-Isolation und -Aufreinigung (Tabelle 4) stammten von den Firmen:

- Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland (Qiagen)
- Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland (Roche)

Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Kits und deren Hersteller

Kit	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche
Plasmid Maxi Prep Kit, Midi Prep Kit, Miniprep Kit	Qiagen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Midi Kit	Qiagen

2.1.2 Versuchstiere

Fünf weibliche, legereife Hühner der Rasse White Leghorn mit den Laufnummern H25-H29 wurden von der Achternbosch Agrarhandelsgesellschaft mbH, Hückelhoven, Deutschland bezogen. Alle Tierversuche waren vom Regierungspräsidium des Landes Nordrhein-Westfalen genehmigt unter der RP-Nummer: 23.203.2 AC9, 15/98.

2.1.3 Peptide, Plasmide und Primer

2.1.3.1 ADAM12 Peptide

Fünf Peptidsequenzen mit den Referenznummern 2799-2803 (Tabelle 5) wurden von der Firma Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland (Biotrend) in jeweils zwei Versionen synthetisiert: mit Ovalbumin konjugiert und biotinyliert. Die Peptide wurden in mindestens 80%iger Reinheit geliefert. Für den Phagen-ELISA wurden die Peptidsequenzen 2799-2803 von der Firma AplaGen GmbH, Baesweiler, Deutschland synthetisiert und biotinyliert.

Tabelle 5 Die Peptidsequenzen 2799-2803 und ihre Eigenschaften

Peptidlaufnummer	Sequenz	Lage/Auswahlkriterium
2799	GGASRPVIGTN	Fusionspeptid-ähnliche Sequenz
2800	CRDSSNSCDLPEFC	Disintegrin-ähnliche Domäne
2801	HELGHNFGMNHD	Zinc Binding Site
2802	ERGQGQEPVG	ADAM12-S spezifisch
2803	WETGLRLAPL	ADAM12-L spezifisch

2.1.3.2 Phagemidvektor pComb3HSS

Das Phagemid pComb3HSS wurde von Carlos F. Barbas, Scripps Institute, La Jolla, USA, bezogen. Von dem in Abbildung 5 und Tabelle 6 dargestellten Phagemid pComb3H abgeleitet, sind in dem Phagemidvektor pComb3HSS als Platzhalter zwei Stuffer Segmente (SS) für einen unspezifischen scFv-Antikörper einkloniert (Abbildung 6) (http://www.scripps.edu/barbas/phage_display.html).

Tabelle 6 Funktion ausgewählter Gene des Phagemidvectors pComb3H

Gen	Funktion
F1 ori	Einzelstrangreplikation
AmpR	Ampicillin-Resistenz
LacZ	Promoter
OmpA	Leader-Sequenz für die leichte Kette
PelB	Leader-Sequenz für die schwere Kette
genIII	Membranprotein

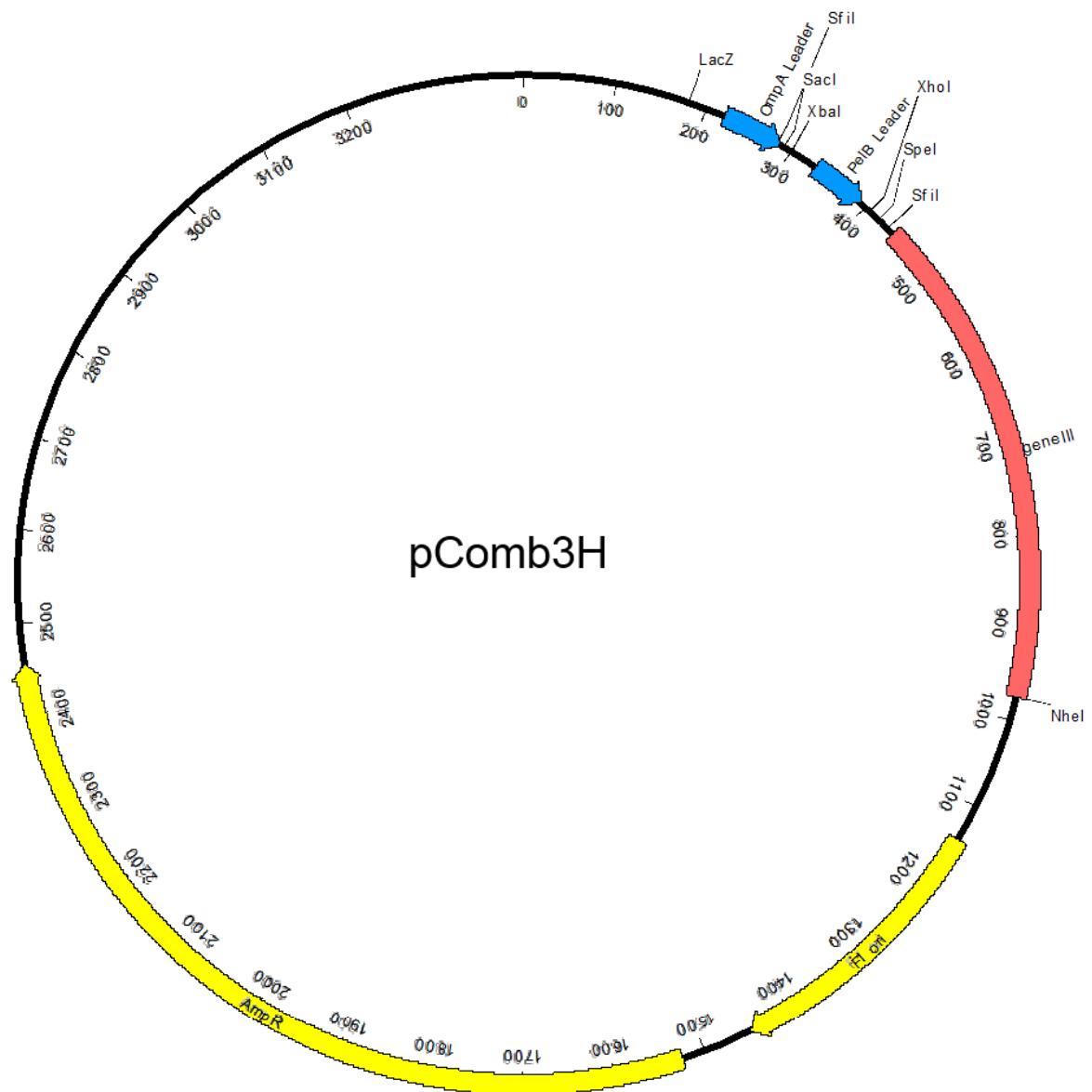


Abbildung 5: Schematische Genkarte des Phagemidvektors pComb3H

(http://www.scripps.edu/barbas/content/pcomb_images/pcomb_images_files/pComb_Maps/pComb3H_Maps.pdf).

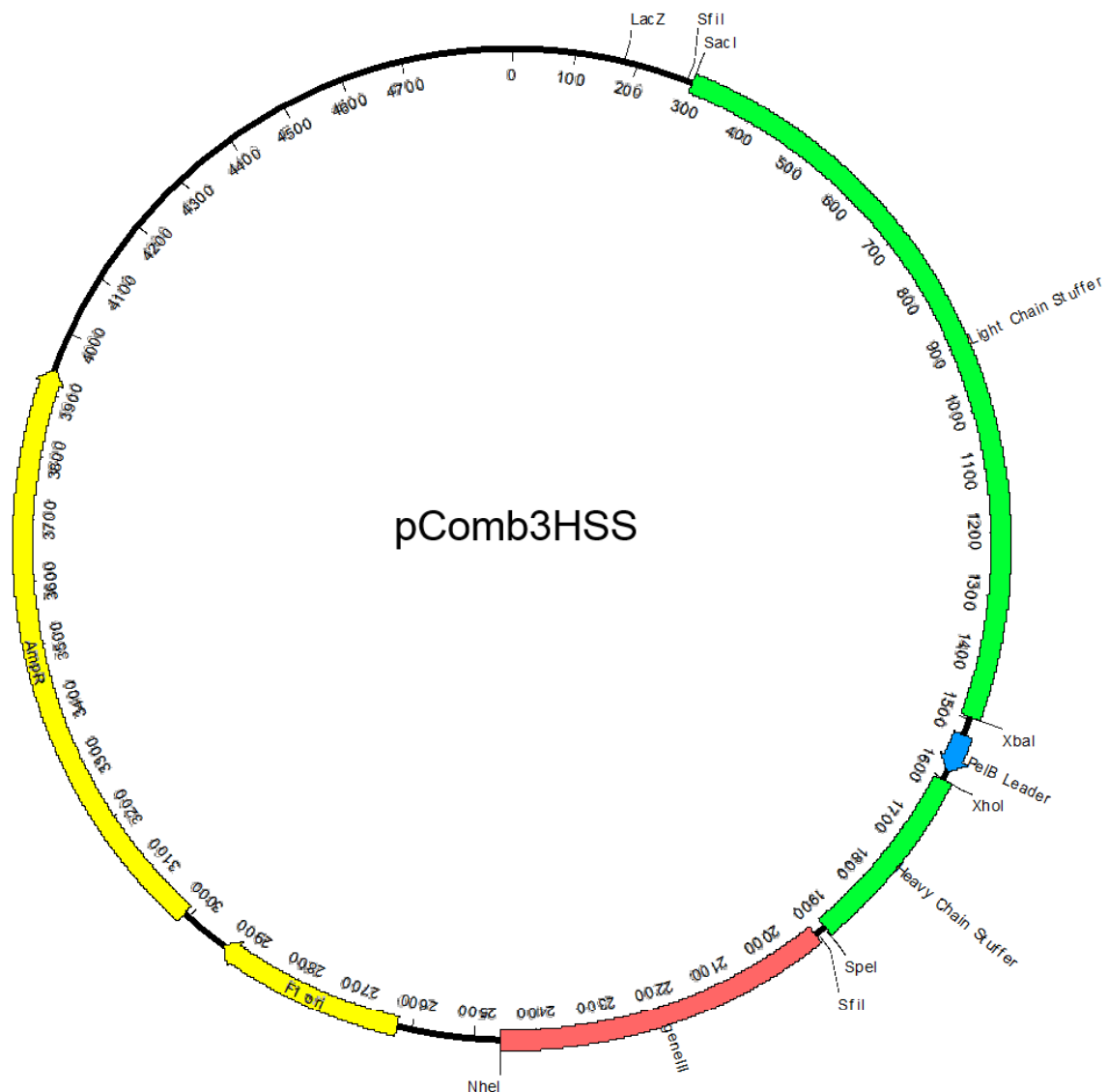


Abbildung 6: Schematische Genkarte des von pComb3H abgeleiteten Phagemidvektors pComb3HSS. Dabei sind zwei Stuffer Segmente (SS, grün markiert) eines unspezifischen scFv-Antikörpers als Platzhalter einkloniert.

(http://www.scripps.edu/barbas/content/pcomb_images/pcomb_images_files/pComb_Maps/pComb3H_Maps.pdf).

2.1.4 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland synthetisiert. Die Sequenzen für die jeweiligen Primer sind in den Tabellen 7-9 aufgeführt. Gelagert wurden sie bei -70°C in einer 100 µM wässrigen Lösung, aus der auf die jeweilige Arbeitskonzentration verdünnt wurde.

Tabelle 7 **Primer für die schwere Kette Vh**

Primer	Sequenz
CSVHo-F	5' GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GAG 3'
CSCG-B	5' CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CC 3'

Tabelle 8 **Primer für die leichte Kette Vk**

Primer	Sequenz
CSCVK	5' GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC 3'
CKJo-B	5' GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G 3'

Tabelle 9 **Primer für die Overlap-PCR**

Primer	Sequenz
CSC-B	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA 3'
CSC-F	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG 3'

Zur Amplifikation der cDNA kamen Oligo-p(dT)-Primer aus dem First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) der Firma Roche Diagnostics zum Einsatz.

2.1.5 Enzyme

Die Enzyme für Amplifikation, Splice-Overlap-Extension-PCR und Ligation (Tabelle 10) wurden mit den zugehörigen Pufferlösungen von folgenden Firmen bezogen:

- Promega GmbH, Mannheim, Deutschland (Promega)
- Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland (Qiagen)
- Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland (Roche)

Tabelle 10 Übersicht über die verwendeten Enzyme und deren Hersteller

Enzym	Hersteller
AMV Reverse Transkriptase (im First Strand cDNA Synthesis for RT-PCR (AMV) Kit enthalten)	Roche
<i>Sfi</i> I	Roche
T4 DNA Ligase	Roche
Taq DNA Polymerase	Promega
Taq DNA Polymerase	Qiagen

2.1.6 Bioorganismen

2.1.6.1 *E. coli*-Stämme

Als Rezipienten für rekombinante DNA, zur Amplifikation und Isolierung von Phagen und Plasmiden und zur Produktion des M13-Phagen wurden *Escherischia coli* (*E. coli*)-Stämme (Tabelle 11) von folgenden Firmen bezogen:

- Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland (Agilent)
- Life Technologies, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland (Life Technologies)
- New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland (BioLabs)

Tabelle 11 Bezugsfirmen und Eigenschaften der verwendeten *E. coli*-Stämme

Stamm	Hersteller	Genotyp	Resistenz
XL1-Blue	Agilent	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Tetrazyklin
ER2738	BioLabs	F'proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(TetR)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5	Tetrazyklin
TG1	Agilent	F' traD36 lacIq(lacZ)M15 proA+B+/supE (hsdM-mcrB)5 (rk-mk+McrB-) thi (lac-proAB)	-
TOP10 (elektro-kompetent)	Life Technologies	F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG>	Streptomycin

2.1.6.2 Helferphage M13KO7

Der Helferphage M13KO7 für das Phage Display und die Erstellung der Phagenbibliotheken wurde von der Firma GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden bezogen. Die Genkarte ist in Abbildung 7 und Tabelle 12 dargestellt.

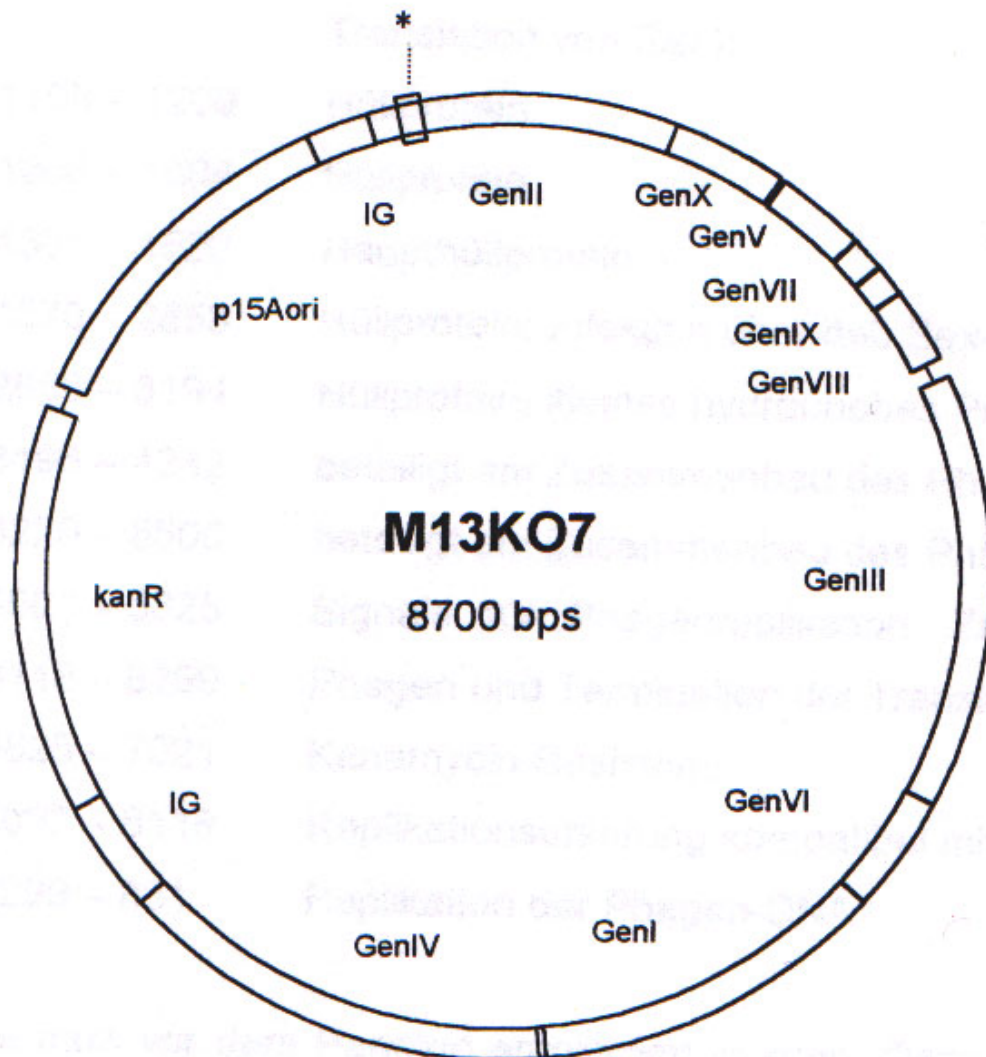


Abbildung 7: Schematische Genkarte des Helferphagen M13KO7. Der Phage enthält das Resistenzgen für Kanamycin (kanR) als Selektionsmarker und den p15Aori Replikationsursprung, der kompatibel ist für eine Replikation in *E. coli*.

Tabelle 12 Lage und Funktion der Gene des Helferphagen M13KO7

Gen	Position	Funktion
GenX	496-831	DNA Replikation
GenV	843-1106	bindet und stabilisiert den \pm Strang; stoppt die Translation von GenII
GenVII	1108-1209	Hüllprotein
GenIX	1206-1304	Hüllprotein
GenVII	1301-1522	HauptHüllprotein
GenIII	1579-2853	Hüllprotein, Infektion über den Sex-Pilus von E. coli
GenVI	2856-3194	Hüllprotein, kleines hydrophobes Protein
GenI	3196-4242	beteiligt am Zusammenbau des Phagen
GenIV	4220-5500	beteiligt am Zusammenbau des Phagen
IG	5501-5825 8118-8299	Signale für Phagenreplikation, Zusammenbau des Phagen und Termination der Transkription
kanR	5825-7021	Kanamycin-Resistenz
p15Aori	7092-8118	Replikationsursprung kompatibel mit E. coli
GenII	8299-831	Replikation der Phagen-DNA

2.1.7 Antikörper

Die Antikörper für den Phagen-ELISA (Tabelle 13) wurden von den Firmen Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland (Dako) und GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden (GE Healthcare) bezogen.

Tabelle 13 Übersicht über die verwendeten Antikörper, deren Hersteller und Funktion

Antikörper	Hersteller	Funktion
Anti-M13	GE Healthcare	Sekundärantikörper für den Phagen-ELISA
Anti-Maus-HRP	Dako	Tertiärantikörper für den Phagen-ELISA

2.1.8 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Lösungen (Tabelle 14) wurden, wenn nicht anders angegeben, durch Autoklavieren (25 min/121°C/2 bar) sterilisiert. Nicht thermostabile Komponenten wurden sterilfiltriert. Die pH-Einstellung erfolgte über Titration mit NaOH oder HCl. Alle Angaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf 1l Gesamtvolumen.

Tabelle 14 Mischungsverhältnisse von Puffern, Lösungen und Medien

Lösungsname	Zusammensetzung
2xYT Medium	Trypton 16 g (Merck) Hefeextrakt 10 g (Merck) NaCl 5 g (Carl Roth) in destilliertem Wasser lösen, auf pH 7 einstellen
Antibiotika-Stammlösungen	Ampicillin (Life Technologies) 25 mg/ml destilliertes Wasser Kanamycin (Life Technologies) 35 mg/ml destilliertes Wasser Tetrazyklin (Life Technologies) 5 mg/ml in Ethanol wässrige Lösungen sterilfiltrieren
Agarosegel (1%)	Agarose (Roche) 1 g bidestilliertes Wasser 100 ml 50% TAE 2 ml Ethidiumbromid 10 µl (5,25 mg/ml H ₂ O)
Blockierungspuffer	Milchpulver (Carl Roth) 30 g in PBS (Merck), keine Sterilisation
Elutionspuffer	HCl (Carl Roth) mit 2M Glycin (Merck) auf pH 2,2 einstellen sterilfiltrieren
LB (lysogeny broth) Medium	Pepton (Merck) 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 10 g in destilliertem Wasser lösen, auf pH 7 einstellen
LB Agarplatte	Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 10 g Agar (Merck) 20 g in destilliertem Wasser lösen, auf pH 7 einstellen, in Petrischalen (Greiner) gießen
LB Weichagar	Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 10 g Agar 7 g in destilliertem Wasser lösen, auf pH 7 einstellen

Lösungsname	Zusammensetzung
LB/Amp Medium	Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 10 g in destilliertem Wasser lösen, auf pH 7 einstellen, nach dem Autoklavieren in das abgekühlte LB Medium 50 mg sterilfiltriertes Ampicillin (Life Technologies) geben
LB Bio Medium	Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 5g in destilliertem Wasser lösen, auf pH 7 einstellen
PBS	NaCl 140 mM KCl (Merck) 2,7 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM KH ₂ PO ₄ 1,8 mM in destilliertem Wasser lösen, mit HCl auf pH 7,4 einstellen
PBST	Tween 20 (Sigma-Aldrich) in der jeweils angegebenen Konzentration in PBS lösen
PEG/NaCl	PEG 8000 (Sigma-Aldrich) 150 g NaCl 146 g in destilliertem Wasser lösen
PIC/PBS	1 Tablette cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) in 25 ml PBS lösen, sterilfiltrieren
SOC Medium	Pepton 20 g Hefeextrakt 5 g NaCl 0,5 g KCl 250 mM 10 ml in 950ml destilliertem Wasser lösen, auf pH 7 einstellen, mit destilliertem Wasser auf das Endvolumen auffüllen und autoklavieren, vor Gebrauch Zugabe von 5 ml autoklaviertem 2 M MgCl ₂ und 20 ml sterilfiltrierter 1 M Glucose
TAE 50%	Tris (Merck) 242 g Eisessig 57,1 ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5 M, pH 8,0 100 ml mit destilliertem Wasser lösen
TrisBase	Tris 2 M in destilliertem Wasser lösen
Tris-HCl 10 mM	Tris 1,21 g in 900 ml destilliertem Wasser lösen, pH mit HCl auf pH 7,4 einstellen, auf 1000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen

2.1.9 Geräteliste

Es kamen Geräte der in Tabelle 15 aufgelisteten Hersteller zum Einsatz.

Tabelle 15 **Übersicht über die verwendeten Geräte und deren Hersteller**

Hersteller	Gerät
Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	Zentrifuge J2-21 Rotoren JA-14 und JA-20
Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK	Techne PCR Thermo Cycler
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Kombischüttler KL2 Vortexer Genie 1
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	diverse Pipetten Thermomixer 5350 02704 Tischzentrifuge 5417R Inkubatorschüttler Innova 4000 Inkubatorschüttler Innova 4300
Flowgen Instruments Ltd., Lichfield, UK	Electroporator EasyjecT Plus
GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden	Elektrophoresekammer Gelträger Probenkämme Netzteile EPS 601, EPS 301, EPS 3500XL Photometer Ultrospec 3100 pro
Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland	Kühlzentrifuge Labofuge 400 R Minifuge RF Sterile Arbeitsbank Laminar Air Flow TL 2472
Hirayama Manufacturing Corporation, Saitama, Japan	Autoklav HV-25
Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland	Wärmeschränk
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Wasserbad
M.u.T. GmbH, Berlin, Deutschland	Tiefkühlschränk ProfiLine ECU 5085-5

Hersteller	Gerät
Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	µMACS Separator MACS Multistand
Polaroid Corporation, Waltham, USA	Fotodokumentationssystem GelCam
Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland	Tiefkühlschrank Economic Froster
Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	Feinwaage Genius ME 145-OCE
Spectronics Corporation, Westbury, USA	UV Transluminator TR 302

2.2 Methoden

2.2.1 Genehmigung der gentechnischen Arbeiten S1

Alle gentechnologischen Arbeiten wurden in einem S1-Labor durchgeführt. Die gentechnische Anlage war durch das Regierungspräsidium und das Landesumweltamt des Landes Nordrhein-Westfalen genehmigt (AZ: (55.8867/8267-7/93) S21-K-1.19.99).

2.2.2 Herstellung der Phagenbibliothek

2.2.2.1 Immunisierung der Hühner und Isolierung der Gesamt-RNA

Für die Immunisierung erhielten die fünf Hühner mit den Laufnummern H25-H29 je drei Injektionen mit 300 µg jeweils eines der Ovalbumin-konjugierten Peptide 2799-2803 (Biotrend), gegen die spezifische Antikörper gebildet werden sollten (Tabelle 16). Die Injektionen der Peptide erfolgten intramuskulär in den Brustmuskel im Abstand von zwei bis drei Wochen unter Zugabe von Freund-Adjuvans zur Verstärkung der Immunantwort (erste Injektion mit komplettem Freund-Adjuvans, die folgenden beiden Injektionen mit inkomplettem Freund-Adjuvans). Die Tiere wurden 8 Wochen nach der letzten Injektion durch einen Schlag betäubt und enthauptet.

Tabelle 16 Zuordnung Huhnlaufnummer mit Antigen

Huhnlaufnummer	Antigen
H25	2800
H26	2802
H27	2799
H28	2801
H29	2803

Nach der Tötung der Tiere wurden die Milzen herauspräpariert und sofort in kaltes PBS gelegt. Im ersten Präparationsschritt wurde die Kapsel um das Organ entfernt, die Milz jedes Tieres in vier bis fünf kleine Stücke geschnitten und diese mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur RNA-Isolation wurden 600 mg Milzgewebe

gemörsert, in 12 ml Lysepuffer RLT aus dem RNeasy Midi Kit von Qiagen aufgenommen und mittels Spritze und Kanüle homogenisiert.

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den Milzlymphozyten erfolgte über das RNeasy Midi Kit (Qiagen) gemäß der Anleitung des Herstellers. Die Konzentration und die Reinheit der gewonnenen RNA wurde in einer 1:40-Verdünnung im Photometer (GE Healthcare) durch Messung der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm berechnet und dokumentiert. Dabei wiesen Reinheitswerte unter 1,6 (dem Quotienten von $A_{260}:A_{280}$ entsprechend) auf eine starke Verschmutzung hin.

2.2.2.2 Generierung und Amplifikation der cDNA

Die reverse Transkription der gewonnenen RNA in cDNA wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) von Roche Diagnostics nach Herstelleranleitung mit 16,4 µl RNA (~6 µg) in dem Ansatz aus Tabelle 17 durchgeführt.

Tabelle 17 Mengenverhältnisse für die reverse Transkription der RNA in cDNA (alle Angaben in µl)

	Menge
RNA	16,4
Reaktionspuffer (10fach konzentriert)	4
MgCl ₂	8
Desoxynukleotid-Mix	4
Oligo-p(dT) 15-Primer	4
RNase-Inhibitor	2
AMV Reverse Transkriptase	1,6
Gesamtvolumen	40

Der Gesamtansatz wurde für 1 h bei 42°C inkubiert. Die erstellte cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

Geeignete Primer ermöglichten es, die kodierenden Bereiche für die leichte und die schwere Kette der Antikörper aus der cDNA gesondert zu vervielfältigen. Dabei

dienten CSVHo-F, CSCG-B (Tabelle 7) als Primer für die schwere Kette (Vh) und CSCVK, CKJo-B (Tabelle 8) als Primer für die leichte Kette (Vk).

Die Puffer, Lösungen und Taq DNA Polymerase wurden von den Herstellern Promega und Qiagen gebrauchsfertig bezogen und in folgenden Ansätzen verwendet (Tabelle 18).

Tabelle 18 Mengenverhältnisse für die jeweiligen Ansätze der cDNA-Amplifikation mit der Taq DNA Polymerase der Hersteller Promega und Qiagen (alle Angaben in µl)

	Promega	Qiagen
cDNA	1	2
Reaktionspuffer (10fach konzentriert)	10	10 (+15 mM MgCl ₂)
MgCl ₂ (25 mM)	10	4
Desoxynukleotid-Mix (10 mM)	2	2
Primer 1 (0,5 µg/µl)	2	2
Primer 2 (0,5 µg/µl)	2	2
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,6	0,6
bidestilliertes Wasser	78,4	77,4
Gesamtvolumen	100	100

Die PCR wurde für jede cDNA separat in beiden Ansätzen im PCR Thermo Cycler (Bibby Scientific) über 30 PCR-Zyklen mit den Parametern in Tabelle 19 durchgeführt.

Tabelle 19 PCR-Zyklusparameter für die cDNA-Amplifikation

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94°C	15 s
Annealing	56°C	15 s
Extension	74°C	90 s

Die Amplifikation der variablen Regionen der schweren und der leichten Kette wurde vor Aufreinigung auf einem analytischen 1%-igen Agarosegel überprüft.

Dazu wurde die Agarosegel-Mischung (Tabelle 14) bis zur vollständigen Auflösung der Agarose für 5 Minuten in der Mikrowelle erwärmt. Das Gel wurde auf einen mit einem Kamm versehenen Gelschlitten (Gelelektrophoresesystem mit Geräten und Zubehör von GE Healthcare Life Sciences) gegossen. Nach dem Gelieren der Masse wurde der Kamm entfernt, so dass in der glatten Geloberfläche Slots entstanden, in die die Proben pipettiert werden konnten, die zur Elektrophorese vorgesehen waren. Diese wurden zuvor mit je 1 µl Bromphenolblau als Farbmarker versehen. Die Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 30 mA über einen Zeitraum von ca. 60 Minuten, wobei der im Tageslicht sichtbare Farbmarker Bromphenolblau zur Abschätzung des Elektrophoresefortschrittes diente. Durch das Ethidiumbromid im Gel wurde die DNA in UV-Licht fluoreszierend sichtbar und konnte über eine Polaroidfilmbelichtung (GelCam, Polaroid) festgehalten werden. Eine DNA-Ladder mit vordefinierten Markerbanden (Biomol) wurde zum Abschätzen der Bandengrößen der zu untersuchenden DNA mitaufgetragen. Die für die leichten Ketten kodierenden Fragmente (Vk) hatten eine Länge von ca. 300 Basenpaaren (Bp), die Fragmente für die schweren Ketten (Vh) eine Länge von ca. 400 Bp.

Zur Entfernung von Primern, Nukleotiden und der Taq DNA Polymerase aus dem PCR-Ansatz wurde der komplette Ansatz mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen gemäß Anleitung aufgereinigt.

Bei der Amplifikation der variablen Regionen entstanden neben dem gewünschten Amplifikationsprodukt weitere Fragmente, die vor der weiteren Verarbeitung aus dem Ansatz entfernt werden mussten. Dazu kam mit der „Freeze-Squeeze“-Methode eine präparative Agarosegelelektrophorese zum Einsatz (modifiziert nach Tautz und Renz, 1983). Dazu wurde der zuvor über das QIAquick PCR Purification Kit gereinigte PCR-Ansatz erneut auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Am Ende der Elektrophorese wurden die gewünschte Banden (Vk 300 Bp, Vh 400 Bp) unter UV-Lichtkontrolle (Spectronics Corporation) ausgeschnitten und die Agaroseblöcke in Parafilm eingepackt bei -20°C für mindestens 2 h (alternativ bei -70° für mindestens 30 Minuten) eingefroren („Freeze“). Durch das Einfrieren wurde die Gelstruktur zerstört. Anschließend wurden die Gelblöcke in den Parafilm-Taschen zerdrückt („Squeeze“) und in aufgetautem Zustand auf einen Ultrafree-Filter (Merck) gegeben. In zwei Zentrifugationsschritten

wurde die DNA von den Gelbestandteilen getrennt. Die erste Zentrifugation erfolgte mit 800 xg über 5 Minuten bei Raumtemperatur, die zweite mit 5000 xg über 5 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur. Die DNA im Eluat wurde mit 8M LiCl (1/9 des Eluatvolumens) und Ethanol 100% (2,5 faches Volumen von Eluat und LiCl) über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die Suspension für 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 500 µl Ethanol 70% aufgenommen und erneut für 5 Minuten bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet, in 10 mM Tris-HCl oder destilliertem Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert. Das Aufreinigungsergebnis wurde auf einem 1%-igen Agarosegel kontrolliert. Waren zusätzliche Banden erkennbar, wurde die Aufreinigung wiederholt.

2.2.2.3 Splice-Overlap-Extension PCR und Klonierung in den Vektor

Für die Expression eines kompletten single-chain-Antikörpers (scFv-Fragment) mussten die variable Region der schweren (Vh) und der leichten (Vk) Kette fusioniert werden. Dies geschah durch die Splice-Overlap-Extension PCR, die im folgenden als Overlap-PCR abgekürzt wird. Die Sequenzen von Vh und Vk sind im Fusionsbereich komplementär. Dadurch lagerten sich beide DNA-Stränge aneinander und dienten selbst als Primer für die Auffüllreaktion. Dann erfolgte die eigentliche Amplifikation des Fusionsproduktes durch zugefügte außen liegende Primer.

Für eine erfolgreiche Overlap-PCR waren mehrere Faktoren ausschlaggebend. Zunächst mussten Vh und Vk gut aufgereinigt sein, da die Ausbeute an Fusionsprodukt ansonsten durch zusätzliche Amplifikation von unerwünschten Fragmenten abnahm. Besonders wichtig bei der Overlap-PCR war das 1:1-Mengenverhältnis von Vh und Vk. Sonst erfolgte eine asymmetrische PCR mit ebenfalls verringerter Fusionsproduktausbeute. Es wurden jeweils ca. 100 ng von Vh und Vk in die PCR eingesetzt, da zu viel Ausgangsmaterial die Reaktion stören konnte. Die Overlap-PCR wurde mit dem Ansatz in Tabelle 20 über 20 Zyklen mit den Parametern in Tabelle 21 durchgeführt:

Tabelle 20 Mengenverhältnisse des Ansatzes für die Splice-Overlap-Extension PCR (alle Angaben in µl)

	Menge
Vk	10
Vh	10
Reaktionspuffer (10fach konzentriert)	10
MgCl ₂ 25 mM	4
Desoxynukleotid-Mix (10 mM)	2
Primer CSC-B (0,5 µg/µl)	2
Primer CSC-F (0,5 µg/µl)	2
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,6
bidestilliertes Wasser	59,4
Gesamtvolumen	100

Tabelle 21 Zyklusparameter für die Splice-Overlap-Extension PCR

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94°C	15 s
Annealing	56°C	15 s
Extension	74°C	120 s

Das Fusionsprodukt wurde in einem analytischen Agarosegel auf die korrekte Länge von ca. 700 Bp überprüft. Das Overlap-PCR-Produkt wurde anschließend mittels „Freeze-Squeeze“ (2.2.2.2) gereinigt.

Das Phagemid pComb3HSS diente als Vektor, in den das Fusionsprodukt aus der Overlap-PCR als Insert durch eine Ligation eingebracht wurde. Der Vektor und die aufgereinigten Inserts wurden vor der Ligation mit dem Restriktionsenzym *Sfi* I (aus *Streptomyces fimbriatus*) der Firma Roche verdaut. Die Erkennungsschnittstelle von *Sfi* I ist GG°C*CNNNN↓NGG°C°C. Bei dem Vektor pComp3HSS wurde durch einen *Sfi* I-Restriktionsverdau ein Fragment von ca. 1500 Basenpaaren herausgeschnitten, da der Vektor zwei Stuffer-Fragmente in der Größe von 1200 Bp bzw. 300 Bp in den Klonierungstellen für Vk bzw. Vh enthielt. Die mit *Sfi* I geschnittenen Fragmente konnten nicht religieren, da das Enzym zwei unterschiedliche überhängende Enden

erzeugte. Die Restriktion wurde mit ca. 2 U *Sfi* I/ μ g DNA, dem zugehörigen mitgelieferten Reaktionspuffer (SuRE/Cut Buffer M) und 1:10 verdünntem BSA (Sigma-Aldrich) bei 50°C über Nacht durchgeführt. Nach der *Sfi* I-Restriktion wurden die Inserts mit dem QIAquick MinElute PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt. Der *Sfi* I-verdaute Vektor wurde mittels „Freeze-Squeeze“ (2.2.2.2) aufgereinigt. Anschließend wurden die Konzentrationen der Resuspensionslösungen von Inserts und Vektor nach 1:80-Verdünnung der Ausgangslösung analog zur RNA-Konzentrationsmessung in 2.2.2.1 bestimmt.

Die mit *Sfi* I geschnittenen Overlap-Produkte wurden nun in den *Sfi* I geschnittenen Vektor pComb3HSS ligiert. Dazu wurde das jeweilige Insert in dreifachem stöchiometrischem Überschuss eingesetzt und bei 4°C über Nacht durch die T4 DNA Ligase von Roche (in dem zugehörigen Puffer) ligiert (Tabelle 22).

Tabelle 22 Mengenverhältnisse der Ligationsansätze (alle Angaben in μ l)

	H25/H27	H26	H28	H29
Vektor	100	93	100	100
Insert	61	70	57	65
Ligase (1 U/ μ l)	8	15	8	8
Puffer	20	20	20	20
bidest. Wasser	11	2	15	7
Gesamtvolumen	200	200	200	200

Dargestellt sind die Volumenverhältnisse von Insert, Vektor, T4 DNA Ligase, Puffer und destilliertem Wasser in den Ligationsansätze für die jeweiligen Inserts. Für das Insert H25 erfolgte trotz divergenter Konzentrationsmessungen aus praktischen Gründen ein analoger Ligationsansatz wie für das Insert H27.

Vom Ligationsprodukt wurden Testtransformationen in *E. coli*-Bakterien des elektrokompenten Stammes TOP10 (Life Technologies) durchgeführt. Dafür wurden 3 μ l Ligationsprodukt und 50 μ l auf Eis aufgetaute *E. coli* 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweiminütiger Inkubation bei 42°C folgte eine erneute fünfminütige Inkubation auf Eis. Der Ansatz wurde in 800 μ l LB aufgenommen und 1 h bei 37°C auf dem Schüttelinkubator (Eppendorf) inkubiert. 100 μ l dieser Kultur wurden auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Waren die

Platten am nächsten Morgen gut bewachsen, wurden von jeder Platte 10 Kolonien mit jeweils einem sterilen Zahnstocher aufgenommen („gepickt“) und in 10 ml LB über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Morgen wurde eine Plasmidpräparation mit dem Miniprep Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll durchgeführt und die isolierten Plasmide mit *Sfi* I verdaut und auf einem analytischen Agarosegel auf das Vorhandensein einer Bande auf Höhe der korrekten Insertlänge (700 Bp) untersucht. Ein guter Ligationserfolg zeigte sich in einer hohen Nachweisquote korrekter Inserts.

2.2.2.4 Transformation in *E. coli* und Herstellung der Phagenbibliotheken

Das Ligationsprodukt sollte nun mittels Elektroporation in einen geeigneten Bakterienstamm eingebracht werden. Das Prinzip der Elektroporation beruht darauf, dass durch einen elektrischen Puls vorübergehend wässrige Kanäle in den Zellmembranen der Bakterien entstehen. Durch diese Kanäle können dann mehrfach geladene Moleküle (z.B. DNA) in die Zelle gelangen. Der Strompuls hat bei diesem Vorgang zwei Funktionen. Er bewirkt zum einen die Entstehung dieser Eintrittskanäle und beschleunigt zum anderen die DNA, so dass die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass diese auf eine Zelle trifft und eindringen kann.

Zur Erstellung der einzelnen Phagenbibliotheken PDL25-PDL29 wurde der hoch elektrokompetente *E. coli*-Stamm XL1-Blue der Firma Agilent Technologies verwendet. Für die Erstellung jeweils einer Bibliothek wurden 250 µl XL1-Blue und 50 µl Ligationsprodukt (für die elektrische Transformation salzfrei in Wasser suspendiert) verwendet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsproduktes wurde die Mischung auf fünf vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Sigma-Aldrich) verteilt und im Elektroporator Easyjet Plus (Flowgen Instruments) mit 1,7 kV, 25 µF und 200 Ω, bei einer Impulshalbwertzeit von 5 ms, elektroporiert. Die Zellen wurden umgehend mit jeweils 3x1 ml SOC-Medium aus der Küvette gewaschen, in Reagenzgläser überführt und zur Regeneration eine Stunde auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Nach der Regeneration wurden die fünf Elektroporationsansätze vereinigt, 50 ml 2xYT, 52 µl Ampicillin-Stammlösung und 130 µl Tetrazyklin-Stammlösung hinzugefügt. Von diesem Pool wurden 10 µl, 1 µl, 0,1 µl und 0,01 µl auf LB/Amp-Platten ausplattiert, um die Transformationsrate der Elektroporation zu bestimmen.

Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler wurden weitere 78 µl Ampicillin-Stammlösung zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation erfolgte die Superinfektion mit dem Helferphagen M13KO7 (GE Healthcare), der im folgenden als M13-Helferphage bezeichnet wird. Dazu wurde die Kultur mit 5 ml M13-Helferphagen-Suspension (2.2.3) versetzt und 15 Minuten bei RT ohne Schütteln inkubiert. Danach wurden 130 ml 2xYT, 270 µl Ampicillin-Stammlösung und 120 µl Kanamycin-Stammlösung hinzugefügt. Es wurde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und die Kanamycin-Konzentration in zwei Schritten stündlich in Einzeldosen von 120 µl und 160 µl erhöht. Nach Zugabe aller Antibiotika wurde über Nacht bei gleichen Bedingungen inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Phagenernte. Die Bakterien wurden bei 4500 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und pelletiert (Heraeus-Zentrifuge). Der Überstand, in dem sich die Phagen befanden, wurde mit ¼ seines Volumens an PEG/NaCl für eine Stunde auf Eis gekühlt und anschließend bei 11.500 rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet enthielt die Phagen und wurde je nach Größe und Löslichkeit in 500-1000 µl PIC/PBS resuspendiert. Bei 13.000 rpm und 4°C wurden die letzten Bakterienreste für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand bei 4°C gelagert.

Aus den fünf Ligationsprodukten mit den Inserts von H25-H29 wurden gesondert fünf Phagenbibliotheken (phage display libraries, PDL) erstellt, die analog zu den Hühnerlaufnummern bezeichnet wurden: PDL25, PDL26, PDL27, PDL28 und PDL29. Für das Panning wurden die einzelnen PDLs zu einer gemeinsamen PDL25-29 gepoolt. Je 50 µl der fünf PDLs wurden mit 2 ml ER2738 (New England BioLabs) E. coli-Kultur gemischt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Diese fünf Einzelkulturen wurden mit jeweils 13 ml LB aufgefüllt und mit je 12 µl Ampicillin-Stammlösung 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von je 1 ml M13-Helferphage wurde für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die fünf Ansätze wurden anschließend vereinigt und mit 120 ml LB, 275 µl Ampicillin-Stammlösung, 120 µl Kanamycin-Stammlösung bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Die Kanamycin-Konzentration wurde in stündlichem Abstand in zwei Schritten mit 120 µl und 160 µl Stammlösung erhöht.

Am nächsten Morgen erfolgte analog zur Erstellung der einzelnen PDLs die Phagenernte der gepoolten Bibliothek PDL25-29. Die geernteten Phagen wurden bei 4°C gelagert.

2.2.3 Anzucht des M13-Helferphagen

Der Vektor pComb3HSS enthält nicht alle Gene, die für die Assemblierung des M13-Phagen benötigt werden. Aus diesem Grund müssen *E. coli*, in denen scFv-präsentierende Phagenbibliotheken kultiviert werden sollen, zusätzlich mit dem M13-Helferphagen infiziert werden. Der Helferphage kodiert für alle zur Assemblierung benötigten Gene, seine DNA wird jedoch weniger effizient verpackt. Es entstehen dadurch überwiegend Phagen mit dem Vektor pComb3HSS als Genom.

Der M13-Helferphage musste vor dem Panning in ausreichender Menge amplifiziert werden. Dazu wurden 10 ml LB-Medium mit dem *E. coli*-Stamm TG1 aus einer Übernacht-Vorkultur angeimpft und 2 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis sich sichtbare Bakterienflocken bildeten. Vom M13-Helferphagen wurden Verdünnungen von 10^{-2} , 10^{-4} und 10^{-6} in LB-Medium hergestellt. Mit jeweils 1 µl jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl der TG1-Kultur beimpft, in 3-4 ml Weichagar pipettiert, mit dem Vortex Genie 1 (Carl Roth) vermischt, auf Weichagar gegossen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 3-4 Phagenkolonien jeder Platte mit einer Impföse in jeweils 100 ml 2xYT überführt und mit 60 µl Kanamycin-Stammlösung bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach jeweils einer Stunde wurden 60 µl und 80 µl Kanamycin-Stammlösung hinzugegeben, und die Kultur über Nacht weiter geschüttelt.

Am nächsten Morgen wurden die Bakterien bei 4500 rpm und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Der Überstand mit den Phagen wurde zur Inaktivierung von Proteasen im Wasserbad (Merck) bei 70°C für 20 Minuten inkubiert und erneut für 10 Minuten bei 4500 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand mit der Phagensuspension wurde anschließend bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung des Phagentiters wurden die Phagen in den Verdünnungsstufen 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} auf einer TG1 *E. coli*-Kultur ausgesät. Dafür wurden 100 µl Bakterien mit 1 µl Helferphagen gemischt, dieses Gemisch in 3 ml LB-Weichagar

überführt und der ganze Ansatz auf eine LB-Platte gegossen. Die Platte wurde über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Plaques ausgezählt. Im Idealfall wird eine Konzentration von mindestens 10^{11} pfu/ml erreicht.

2.2.4 Phage Display

2.2.4.1 Panning der scFv-Bibliothek gegen ADAM12-Peptide

Für die erste Panningrunde wurde die gepoolte Bibliothek PDL25-29 (2.2.2.4) verwendet. Mit dieser wurde zunächst separat gegen jedes der fünf ADAM12-Peptidfragmente selektiert. Diese Strategie musste jedoch aufgrund des außerordentlichen Zeit- und Materialaufwandes verlassen werden. In der Folge wurden die ADAM12-Peptide äquimolar gepoolt und für das endgültige Panning in einer Konzentration von 0,1 µg/100 µl verwendet.

50 µl Phagensuspension der Bibliothek PDL25-29 wurden mit 50 µl Milchpulverlösung (3% in PBS) geblockt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl biotinyliertem ADAM12-Peptidpool (0,1 µg/100 µl) wurde für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurde die µMacs-Säule (Miltenyi Biotec) in den zugehörigen Magneten gestellt, mit 100 µl Äquilibrierungspuffer (Protein Application) gecoatet und zweimal mit 100 µl PBS gewaschen. Zu der Phagen-ADAM12-Mischung wurden 100 µl Streptavidin-MicroBeads (Miltenyi Biotec) hinzugegeben und für 1 Minute bei RT inkubiert. Dabei banden die biotynilierten ADAM12-Peptide an die Streptavidin-MicroBeads. Wurde diese Mischung nun auf die vorbereitete µMacs-Säule gegeben, verblieben die MicroBeads und die an sie über die Streptavidin-Biotin-Bindung gebundenen Antigene (und die wiederum an diese gebundenen Phagen) in der magnetischen Säule. Die Säule wurde mit 500 µl 0,5%ig PBST gewaschen. Anschließend wurden die in der Säule verbliebenen gebundenen Phagen mit 200 µl Elutionspuffer (im Kit enthalten) eluiert. Das Eluat wurde mit 12 µl TrisBase (6 µl/100 µl Elutionspuffer) neutralisiert und für die Phagenaufzucht verwendet.

2.2.4.2 Phagenaufzucht und –ernte

100 µl des neutralisierten Eluats wurden mit 2 ml ER2738-Kultur für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Auffüllen mit 15 ml LB-Medium wurden 100 µl zur

Output-Titration (2.2.4.3) entnommen. Nach Zugabe von 12 µl Ampicillin-Stammlösung wurde über 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert und nach Zugabe von weiteren 18 µl Ampicillin-Stammlösung eine weitere Stunde bei gleichen Bedingungen inkubiert. Nun erfolgte die Superinfektion mit 1 ml M13-Helferphagen während einer Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 85 ml LB Bio-Medium und 170 µl Ampicillin-Stammlösung und 60 µl Kanamycin-Stammlösung wurde eine weitere Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und die Kanamycinkonzentration stündlich in Einzeldosen von 60 µl und 80 µl auf die Endkonzentration gebracht. Danach wurde auf dem Schüttelinkubator über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Bakterien analog zur Phagenernte (2.2.2.4) bei 4.500 rpm für 10 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde mit einem Viertel seines Volumens an PEG/NaCl-Lösung gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut für 30 Minuten mit 11.500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das entstehende Pellet enthielt die Phagen. Es wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 750 µl PIC/PBS resuspendiert. Die Lösung wurde zur Entfernung letzter Bakterienreste erneut 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die so geernteten Phagen konnten bis zu einer Woche bei 4°C gelagert oder direkt für die nächste Panningrunde verwendet werden. Vor Verwendung in der nächsten Panningrunde wurden aus dieser Lösung Verdünnungen für die Input-Titration erstellt (2.2.4.3).

Sollte die PDL in Plasmidform gesichert werden, wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Dazu wurde 100 µl E. coli (ER2738) aus einer Übernachtskultur in 10 ml LB Bio über 2 h inkubiert. 50 µl der zu sichernden Phagensuspension wurden mit der E. coli-Kultur 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 13 ml LB Bio und 12 µl Ampicillin-Stammlösung wurde auf dem Schüttelinkubator für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 18 µl Ampicillin-Stammlösung wurde eine weitere Stunde bei gleichen Bedingungen geschüttelt. Nach Zugabe von weiteren 85 ml LB Bio und 170 µl Ampicillin-Stammlösung wurde über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Plasmidpräparation mittels Qiagen Plasmid Midi Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. In dieser Form war die PDL längerfristig gesichert.

2.2.4.3 Titration der Phagenbibliothek

Die Titration einer Phagenbibliothek ermöglichte die quantitative Erfassung der infektiösen Phagen. Diese Titration wurde vor („Input“) und nach („Output“) einer Panningrunde durchgeführt. Nach der Phagenaufzucht und -ernte jeder Panningrunde wurden aus der Phagensuspension Verdünnungen in den Stufen 10^{-8} , 10^{-10} und 10^{-12} mit LB erstellt. 200 µl der drei Phagenverdünnungen wurden mit jeweils 100 µl ER2738-Kultur 10 Minuten bei RT inkubiert und davon 150 µl auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgemorgen wurden die Kolonien gezählt und die Konzentration in cfu/ml bestimmt.

Für die Output-Titration wurden nach dem Beimpfen der E. coli-Kultur mit dem Phageneluat (2.2.4.2) Verdünnungen in den Stufen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} in LB-Medium erstellt und auf LB/Amp Agar ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Kolonien gezählt und die Konzentration in cfu/ml bestimmt.

Der Output-Titer musste als Zeichen der Selektion bei korrektem Panning niedriger sein als der Input-Titer. Nach Anreicherung durch die Phagenaufzucht und -ernte sollten die Input-Titer auf einem von Runde zu Runde gleichbleibend hohen Niveau bleiben, während die Output-Titer in den ersten Panningrunden als Zeichen für die steigende Spezifität der Phagenantikörper stetig sinken sollten. Ein Anstieg in späteren Panningrunden wies auf eine erfolgreiche Anreicherung spezifischer Phagen hin.

2.2.4.4 Plasmidpräparation des Phagenplasmids

Von einer Output-Verdünnungsplatte der letzten Panningrunde wurden 10 Klone gepickt und über Nacht kultiviert (analog der Testtransformation in 2.2.2.3). Von den Bakterienkulturen wurden Plasmidpräparationen (Qiagen Miniprep Kit) durchgeführt. Nach *Sfi* I-Verdau wurde auf einem analytischen Agarosegel die Lage der Banden der Inserts überprüft.

2.2.5 Evaluation der Phagenantikörper

2.2.5.1 Phagen-ELISA

Zur Isolation einzelner spezifischer Phagenklone wurden einzelne Klone der letzten Output-Platte gepickt und kultiviert mit anschließender Phagenaufzucht und -ernte (2.2.4.2). Diese Phagenklone wurden mittels Phagen-ELISA auf ihre Spezifität gegen die ADAM12-Peptidsequenzen (AplaGen) untersucht. Dabei wurde nicht gegen den ADAM12-Peptid-Pool aus dem Panning, sondern gegen jedes ADAM12-Peptid separat getestet.

Die verwendeten ELISA-Mikrotiterplatten waren mit Streptavidin vorbeschichtet (Steffens oder Thermo Fisher). Ihre Wells wurden mit je 100 µl einer ADAM12-Peptidlösung (100 µg/ml biotinyliertes Peptid in PBS) beladen und über Nacht inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Wells, die nicht mit Protein beladen wurden. Am nächsten Morgen wurden die Wells ausgeschlagen und 30 Minuten mit 50 µl 3% MP/PBS bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden sie mit 100 µl 0,5%-igem PBST gewaschen. In jedes Well wurden 50 µl Phagen gegeben und 1 h inkubiert. Der Überstand wurde ausgeschlagen. Es wurden 50 µl Anti-M13 Maus Antikörper (1:1000 in 3% MP/PBS verdünnt) in die Wells pipettiert und 30 Minuten inkubiert. Dann wurde dreimal mit 100 µl PBST gewaschen und anschließend 50 µl Anti-Maus-HRP (1:1000 in 3% MP/PBS verdünnt) in die Wells gegeben. Wieder wurde 30 Minuten inkubiert und dreimal mit PBST gewaschen. Schließlich wurden 200 µl SIGMAFAST OPD-Lösung (Sigma-Aldrich, 1 Tablette OPD und eine zugehörige Puffer-Tablette gelöst in 20 ml bidestilliertem Wasser) in die Wells gegeben, die als Enzymsubstrat der Horse Radish Peroxidase (HRP) die Farbreaktion einleitete, die nach 5-30 Minuten sichtbar wurde. Diese wies auf die Bindung spezifischer Phagenantikörper gegen das untersuchte Antigen hin. Zum Stoppen der Reaktion wurden 50 µl einer 1M HCl-Lösung verwendet.

2.2.5.2 Sequenzanalyse und Charakterisierung

Im ELISA identifizierte spezifisch bindende Phagenantikörper wurden kloniert, die Plasmide isoliert und durch die Firma AplaGen, Baesweiler sequenziert. Diese Sequenzen wurden zunächst mit dem über den Internetauftritt des European Molecular Biology Laboratory, The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)

verfügbaren Tool EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite) Needle (Rice, Longden et al. 2000) miteinander verglichen.

Darüber hinaus erfolgte ein Abgleich der Phagenantikörpersequenzen mit Nukleotiddatenbanken über das ebenfalls über die Internetseite des EMBL-EBI zugängliche Tool WU-BLAST (Washington University Basic Local Alignment Search Tool) (McWilliam, Li et al. 2013) und das über die Internetseite des National Center for Biotechnology Information (NCBI) zugängliche Tool Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Johnson, Zaretskaya et al. 2008).

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der Phagenbibliothek

3.1.1 Immunisierung der Hühner und Isolierung der Gesamt-RNA

Die RNA aus den Milzen der Hühner H25-H29 wurden gemäß 2.2.2 isoliert. Die photometrisch bestimmten Konzentrationen und Reinheitsgrade sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Dabei ist die Reinheit der isolierten RNA, gemessen am Quotienten aus $A_{260}:A_{280}$, mit Werten $\geq 1,6$ zufriedenstellend.

Tabelle 23 Messung von Konzentration und Reinheit der isolierten RNA der Hühner H25-29

Huhnlaufnummer	A_{260}	A_{280}	$A_{260}:A_{280}$	Konzentration [ng/ μ l]
H25	0,234	0,139	1,7	374,4
H26	0,442	0,270	1,6	707,2
H27	0,341	0,209	1,6	545,6
H28	0,221	0,128	1,7	353,6
H29	0,409	0,243	1,7	654,4

Ergebnisse der RNA-Bestimmung. Aufgeführt sind die Nummer des Versuchstieres, die Absorption bei 260 nm (A_{260}), die Absorption bei 280 nm (A_{280}) sowie der Quotient aus diesen beiden Werten (entsprechend der Reinheit der RNA). Die errechnete RNA-Konzentration in der unverdünnten Ausgangslösung ist in ng/ μ l angegeben.

3.1.2 Generierung und Amplifikation der cDNA

Nach der reversen Transkription der mRNA in cDNA wurden aus der cDNA die für die jeweiligen schweren (Vh) und leichten (VK) Ketten codierenden Sequenzen der Immunglobulingene mittels PCR amplifiziert (2.2.2.2). Dies geschah methodisch vergleichend in zwei parallelen PCR-Ansätzen (Tabelle 18): 1. mit Promega Taq Polymerase und 2. mit Qiagen Taq Polymerase. Agarosegele, in denen die Produkte der beiden Ansätze aufgetrennt wurden, sind in Abbildung 8 gezeigt.

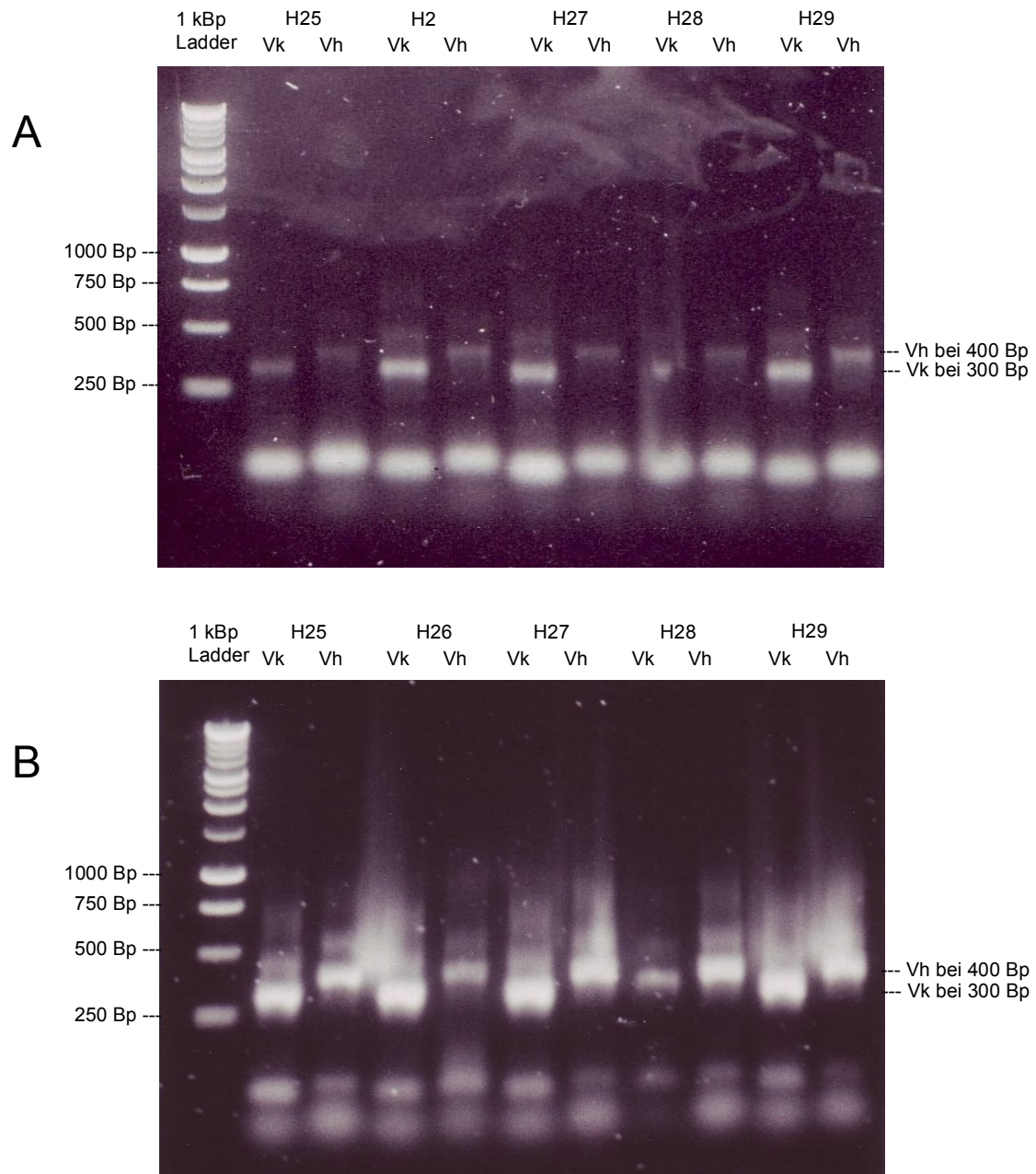


Abbildung 8: Analytische Agarosegele der PCR-Produkte nach Amplifikation der für die leichten und schweren Ketten kodierenden Sequenzen. Abbildung A: Produkte nach PCR mit Promega Taq Polymerase, Abbildung B: Produkte nach PCR mit Qiagen Taq Polymerase. Am linken Rand der Marker (1 kBp Ladder), der die Größenbereiche der DNA-Sequenzen markiert. H25-29 sind die Bezeichnung der Versuchstiere, aus denen die RNA gewonnen wurde, die zur cDNA umgeschrieben worden war. Die Bahnen der Produkte für die leichte Kette (Vh) bzw. die schwere Kette (Vh) sind gekennzeichnet. Die erwarteten Produktgrößen der PCR-Reaktion sind am rechten Bildrand markiert. In beiden Gelen sind Produktbanden in der korrekten Länge zu finden. Allerdings ist die Ausbeute an Produkten mit der Qiagen-Polymerase deutlich höher.

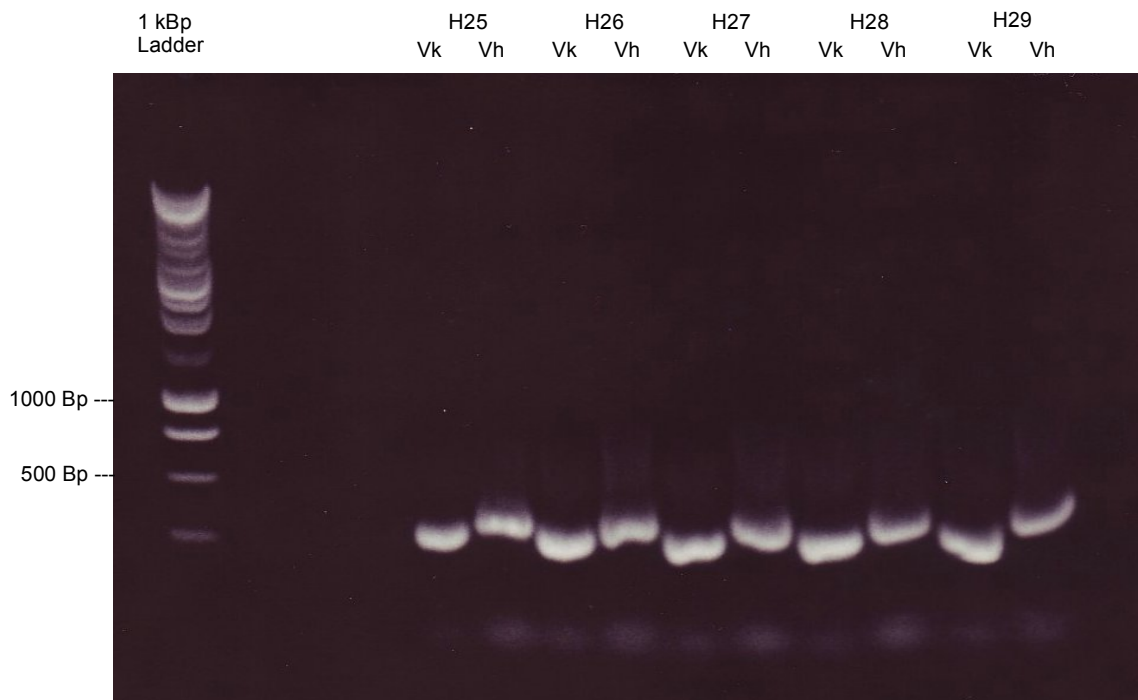


Abbildung 9: Analytisches Agarosegel der PCR-Produkte nach Amplifikation der für die leichten und schweren Ketten kodierenden Sequenzen aus der cDNA von H25 – H29 mit Qiagen Taq Polymerase. Die amplifizierten Vks und Vhs wurden gegen eine 1 kBp Ladder aufgetragen.

Die Ausbeute nach PCR mit der Qiagen Taq Polymerase war deutlich besser als nach PCR mit der Promega Taq Polymerase (Abbildung 8). Die PCRs zur Amplifikation der Vk-Ketten und Vh-Ketten aus der cDNA der Hühner wurden deswegen im weiteren Verlauf mit der Qiagen Taq Polymerase und dem zugehörigen Puffer durchgeführt (Abbildung 9).

Aus den vorhandenen cDNA-Präparationen der Versuchstiere wurden jeweils vier weitere PCR-Ansätze pro Huhn durchgeführt und die erhaltenen Produkte pro Versuchstier und Kette (Vh bzw. Vk) gepoolt. Um die in diesen kumulativen Reaktionen erhaltene DNA präparativ und selektiv zu isolieren wurden präparative Agarosegelelektrophoresen durchgeführt, aus denen die Produktbanden mittels „Freeze-Squeeze“ (2.2.2.3) isoliert wurden.

3.1.3 Splice-Overlap-Extension PCR und Klonierung in den Vektor

Die Isolate aus diesem präparativen Schritt erlaubten die anschließende erfolgreiche Durchführung der Splice-Overlap-Extension PCR. Mittels dieser Reaktion wurden die beiden für Vh und Vk kodierenden Teilsequenzen in ein gemeinsames Produkt überführt, das für die Klonierung in den Vektor pComb3H geeignet war. Die Produkte

der Splice-Overlap-Extension PCR wurden mittels „Freeze-Squeeze“ aus präparativen Agarosegelen aufgereinigt und in 10-20 µl Tris-HCl aufgenommen. Zur Überprüfung des gereinigten Inserts wurde das Overlap-PCR Produkt auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Abbildung 10).

Die Overlap-PCR Produkte und der Vektor pComb3HSS wurden mit *Sfi* I geschnitten und erneut aufgereinigt. Die Konzentrationen der resuspendierten aufgereinigten Inserts und des Vektors sind in Tabelle 24 aufgeführt. Nur bei H25 kam es dabei trotz wiederholter Durchführung zu starken Schwankungen des Messwertes bei dem Insert von H25 (45-405 µg/ml). Da jedoch die visuelle Plausibilitätskontrolle der Konzentration in den analytischen Gelen zeigte, dass die Konzentration in etwa der Konzentration der anderen Inserts zu entsprechen schien, wurde für das Insert von H25 ein analoger Ligationsansatz wie für H27 gewählt.

Tabelle 24 Photometrische Messung der Konzentrationen der Inserts und des Vektors vor Ligation

DNA	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ :A ₂₈₀	Konzentration [µg/ml]
Insert H25	0,101	0,089	1,14	45-405
Insert H26	0,020/0,025	0,012/0,013	1,6/1,8	80/100
Insert H27	0,020	0,011	1,8	80
Insert H28	0,021	0,012	1,8	85
Insert H29	0,019	0,012	1,6	75
pComb3HSS	0,016	0,010	1,6	65

Ergebnisse der Konzentrationsmessung der *Sfi* I geschnittenen Inserts und des Vektors nach Aufreinigung. Aufgeführt ist die jeweilige Absorption bei 260 nm (A₂₆₀), die Absorption bei 280 nm (A₂₈₀) sowie der Quotient aus diesen beiden Werten. Die errechnete DNA-Konzentration in der unverdünnten Ausgangslösung ist in µg/ml angegeben. Für Insert H26 ist auch die zweite Konzentrationsmessung aufgeführt, die Berechnungsgrundlage der Mengenverhältnisse für die endgültige Ligation war.

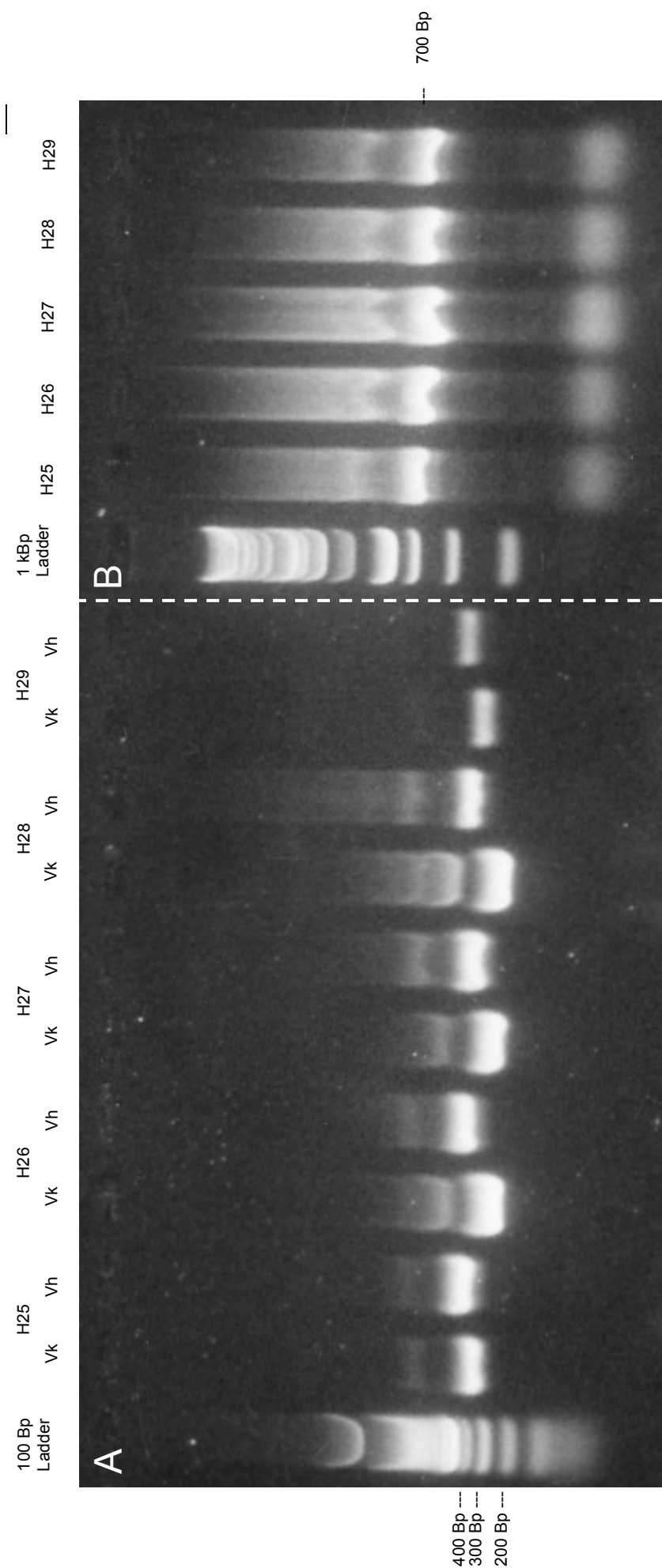


Abbildung 10: A: Die aufgereinigten Vk- und Vh-Ketten wurden gegen eine 100 Bp Ladder aufgetragen. Trotz noch vorhandener Verunreinigungen sind die Ketten in ihrer erwarteten Größe von 300 bzw. 400 Bp gut zu erkennen. **B:** Die aufgereinigten Overlap-PCR Produkte wurden gegen eine 1 kbp Ladder aufgetragen. Auch hier sind noch deutliche Verunreinigungen zu sehen, zudem sind die Banden überladen. Es sind jedoch erwartungsgemäß auf Höhe der 700 Bp-Marke die Overlap-PCR Produkte zu erkennen.

Vom Ligationsprodukt wurden Testtransformationen durchgeführt (2.2.2.3). Jeweils 10 Klone jeder der fünf entstandenen PDLs wurden gepickt und kultiviert. Die Plasmide wurden isoliert und mit *Sfi* I verdaut. Analytische Agarosegele der Verdauung zeigten für die PDL25, PDL27, PDL28 und PDL29 die Inserts bei jeweils 8-9 der zehn Präparationen in Höhe von 700 Bp. Dies entsprach der erwarteten Größe der korrekten Inserts und bestätigte damit durch die hohe Nachweisquote einen guten Ligationserfolg (Tabelle 25, Abbildung 11).

Tabelle 25 Anzahl der nachweisbaren Inserts korrekter Größe

PDL Laufnummer	Anzahl der Inserts korrekter Größe
PDL25	8
PDL26	0
PDL27	9
PDL28	9
PDL29	9

Anzahl der darstellbaren Banden bei der zu erwartenden Länge von 700 Bp des korrekten Inserts für 10 Klone der jeweiligen Phagenbibliotheken. Bei PDL26 sind in den 10 gepickten Klonen keine Inserts der korrekten Größe nachweisbar. In den anderen Testansätzen zeigt sich mit 8-9 korrekten Inserts ein guter Ligationserfolg in der Testligation.

Bei H26 (entsprechend PDL26) konnten trotz mehrmaliger Wiederholung der Ligation und Probetransformation keine Inserts der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Trotzdem wurde entschieden, die Transformation auch für die PDL26 im präparativen Maßstab durchzuführen.

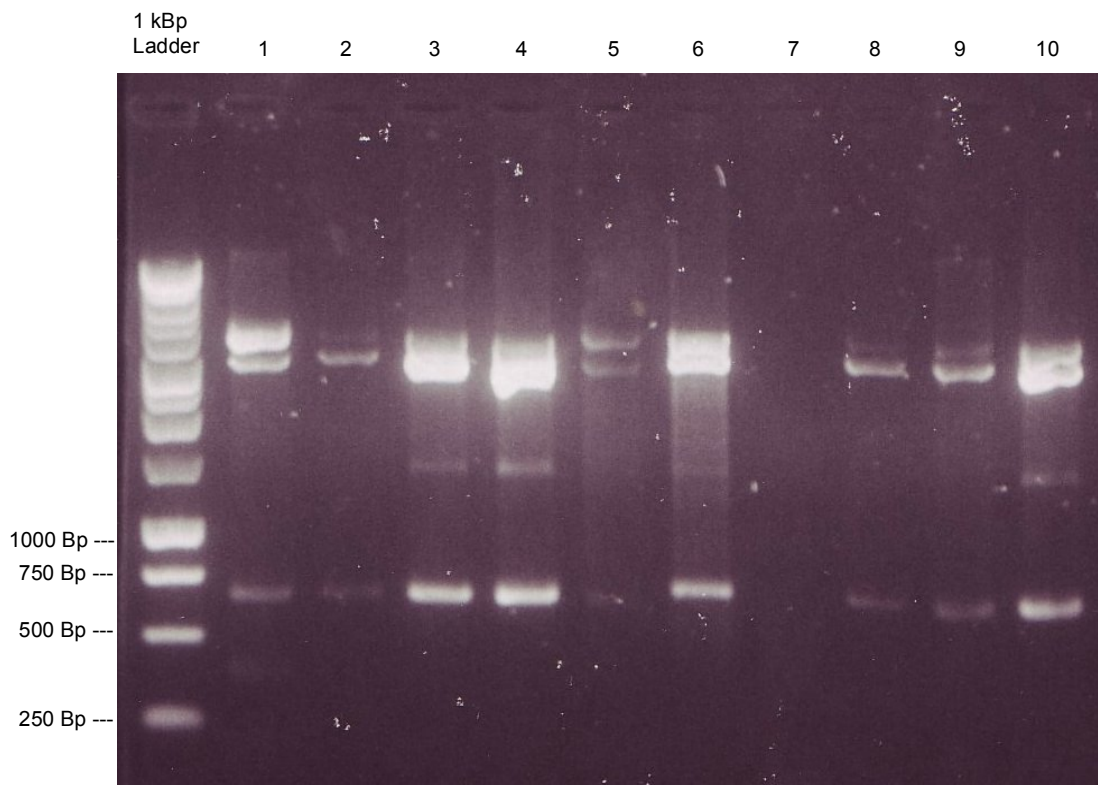


Abbildung 11: Exemplarisch das Agarosegel der *Sfi* I-verdauten PDL29 nach Testtransformation. Bis auf Lane 7 ist in allen Bahnen das korrekte Insert in Höhe der 700 Bp Bande zu sehen.

3.1.4 Transformation in *E. coli* und Herstellung der PDLs

Die aufgereinigten ligierten Plasmide PDL25-PDL29 waren nun bereit für die endgültige Transformation. Die Transformationen wurde nach dem Protokoll aus 2.2.2.4 durchgeführt. Über ausplattierte Verdünnungen der transformierten *E. coli*s wurden die Transformationsraten bestimmt. Diese waren zufriedenstellend mit jeweils $>10^8$ cfu (Tabelle 26):

Tabelle 26 Transformationsraten von PDL25-PDL29

PDL-Laufnummer	Transformationsrate [cfu]
PDL25	$1,9 \times 10^8$
PDL26	$2,7 \times 10^9$
PDL27	$2,6 \times 10^9$
PDL28	$2,02 \times 10^9$
PDL29	$2,37 \times 10^9$

Mit minimal 10^8 cfu zeigen sich zufriedenstellende Transformationsraten bei allen PDLs.

Von den Verdünnungsplatten wurde jeweils ein Klon kultiviert, das Plasmid isoliert und ein *Sfi* I-Verdau durchgeführt. Der Verdau wurde mit einem analogen Verdau der PDLs vor der Transformation verglichen, um sicherzustellen, dass die Plasmide korrekt in die *E. coli* transformiert wurden.

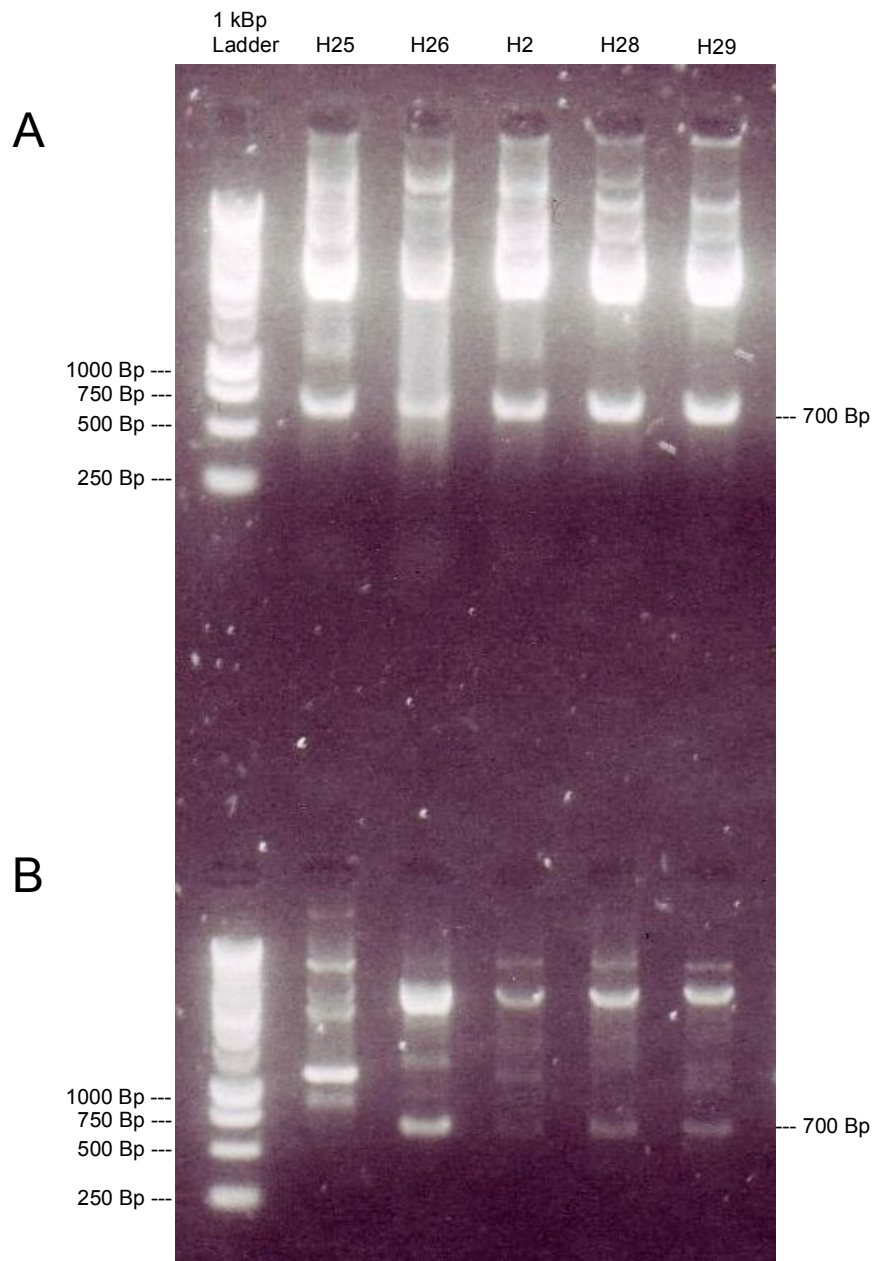


Abbildung 12: *Sfi* I-Restriktion der Plasmide von PDL25-PDL29 vor (A) und nach (B) der präparativen Transformation. Gegen eine 1 kBp Ladder als Marker aufgetragen. Es zeigen sich vor der Transformation bei jeder PDL korrekte Inserts bei der 700 Bp-Marke. Nach der Transformation nur bei PDL26-PDL29.

Dabei wiesen die Plasmide der PDL26-PDL29 sowohl vor als auch nach der präparativen Transformation ein Insert in der korrekten Größe auf (Abbildung 12). Bei

PDL25 war nach ersten präparativen Transformation zunächst keine Bande bei 700 Bp nachzuweisen, so dass eine erneute präparative Transformation (Rate $1,9 \times 10^8$ cfu) durchgeführt wurde. Anschließend ließen sich bei sieben von zehn Klonen Inserts der richtigen Größe nachweisen, so dass von einem Transformationserfolg auszugehen war (Abbildung 13).

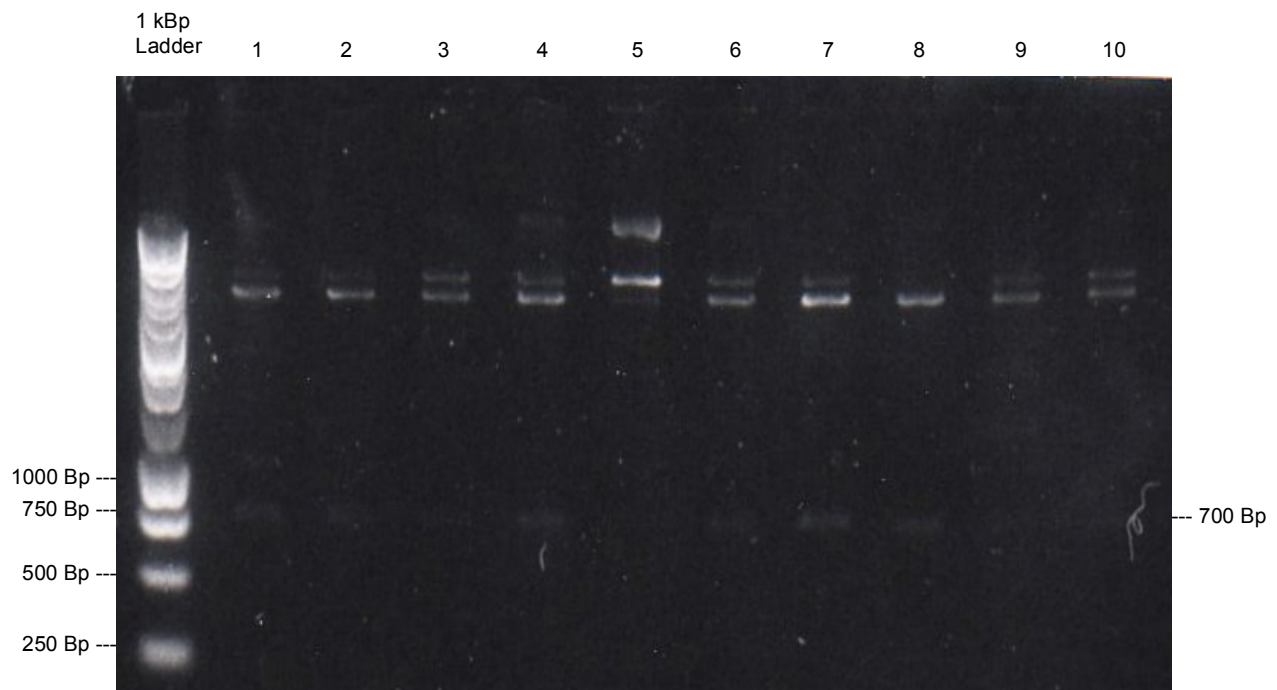


Abbildung 13: *Sfi* I-Verdau von PDL25 nach erneuter Transformation. Es sind in sieben der zehn Lanes die korrekten Inserts in der Länge von 700 Bp zu sehen. Dabei ist Klon 5 nicht ausreichend verdaut.

Die Phagen der einzelnen Bibliotheken PDL25-PDL29 wurden nach Protokoll 2.2.2.4 zur gemeinsamen Phagenbibliothek PDL25-29 gepoolt.

3.2 Phage Display

Aus der gepoolten Phagenbibliothek PDL25-29 wurden durch Panningrunden (2.2.4.1) und Phagenaufzucht und -ernte (2.2.4.2) Klone selektiert, die gegen einen Pool der fünf ADAM12-Peptide gepannt wurden.

Input- und Outputtiter wurden bestimmt (2.2.4.3) und entwickelten sich in vier Panningrunden wie in Tabelle 27 und in Abbildung 14 zu sehen.

Tabelle 27 Panning der gepoolten Phagenbibliothek PDL25-29 gegen einen Pool der ADAM12-Peptide 2799-2803

Runde	Input (cfu/ml)	Output (cfu/ml)
1	$3,5 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^6$
2	$4,75 \times 10^{10}$	$5,85 \times 10^4$
3	$9,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^3$
4	$1,56 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^5$

Die aufeinanderfolgenden Zyklen von Selektion und Amplifikation (Runde) sind mit dem jeweiligen Input an Klonen und dem Output an Klonen aufgeführt. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (cfu) pro ml Bakteriensuspension wurde in Verdünnungsplatten bestimmt. Der Outputtiter fällt zunächst deutlich mit der aufsteigenden Rundenzahl ab und steigt in der letzten Runde wieder deutlich an.

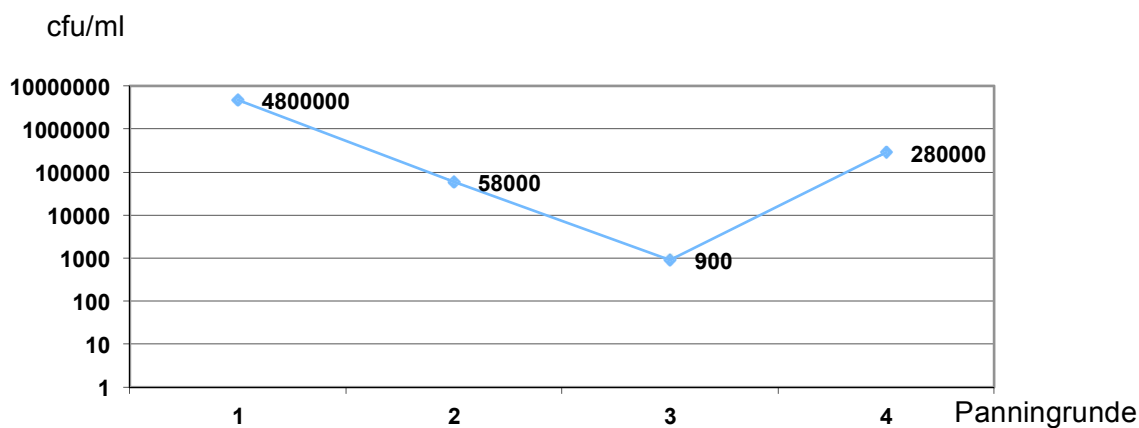


Abbildung 14: Logarithmische Darstellung der Entwicklung der Outputtiter der vier Panningrunden von PDL25-29. Während in den ersten drei Panningrunden der Outputtiter fällt, steigt er nach der 4. Panningrunde wieder an und markiert einen Anstieg der Spezifität der Phagen.

Der in der vierten Runde steigende Outputtiter markierte einen Anstieg der relativen Anzahl bindender Phagen. Das Panning wurde nun beendet, um den Verlust spezifischer Phagenantikörper durch weitere Selektionsrunden zu vermeiden. Der ausplattierte Output der letzten Panningrunde wurde nun verwendet, um einzelne Klone zu picken, zu kultivieren und die individuellen Phagenantikörper auf ihre Spezifität gegen die fünf ADAM12-Peptide zu testen. Vor der Spezifitätstestung wurden 10 gepickte Klone der Outputplatte kultiviert, die Phagenplasmide isoliert (2.2.4.4), mit *Sfi*I-verdaut und auf das Vorhandensein des korrekten Inserts überprüft. Bei 7 von 10 Klonen zeigten sich Banden in der erwarteten Größe (Abbildung 15).

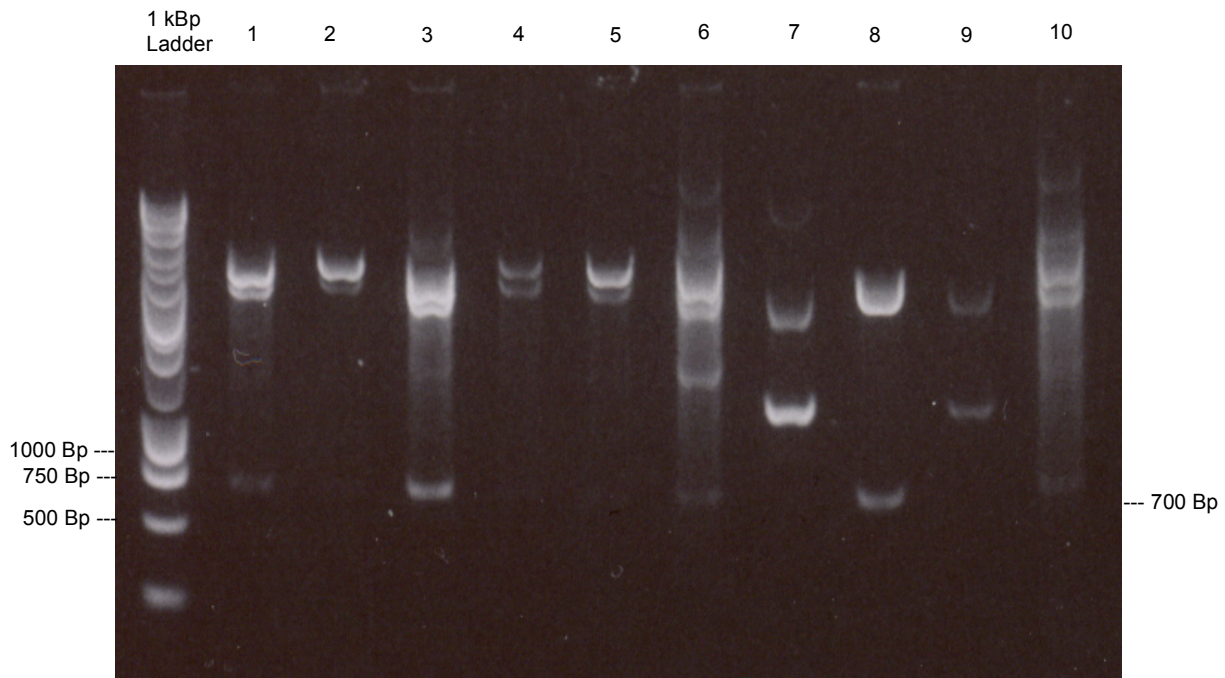


Abbildung 15: Agarosegel mit 10 *Sfi* I-restringierten Klonplasmiden der Outputplatte nach der 4. Panningrunde. Es zeigen sich Banden bei 7 der 10 Banden in der Länge von 700 Bp, die damit die erwartete Größe des korrekten Inserts aufweisen.

3.3 Evaluation der Phagenantikörper

3.3.1 Phagen-ELISA

Für den in 2.2.5.1 beschriebenen Phagen-ELISA wurden insgesamt 48 Klone der Outputplatte der letzten Panningrunde gepickt und kultiviert. Die Phagen wurden aufgezogen und geerntet (2.2.4.2). Mit diesen 48 Phagenklonen wurde separat gegen jedes ADAM12-Peptid mittels ELISA getestet. Eindeutige Farbreaktionen gab es nur bei zwei Klonen gegen das Peptid 2800, die im Folgenden als PDL25-29MK1 und PDL 25-29MK2 bezeichnet werden (Abbildung 16, Tabelle 28).

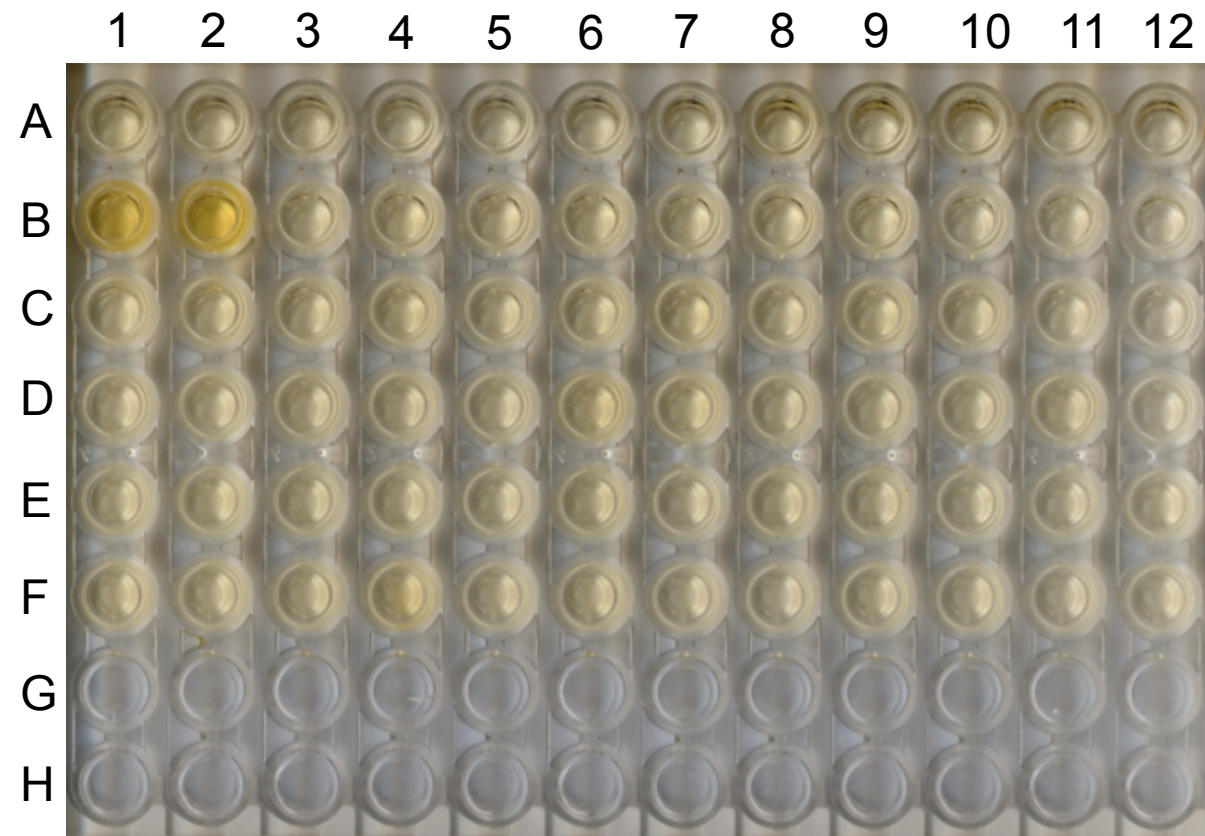


Abbildung 16: Ergebnis des Phagen-ELISA gegen das Peptid 2800. In den Zeilen A und F wurde eine Leerkontrolle durchgeführt. In den Zeilen B-E 48 Phagenklone aufgetragen. Die deutlichen Farbreaktionen in den Wells B1 und B2 identifizieren spezifisch an 2800 bindende Phagenklone. Schematische Darstellung des Ergebnisses in Tabelle 28.

Tabelle 28 Schematische Darstellung des Phagen-ELISA mit dem Peptid 2800

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Die Positivreaktionen in den Wells B1 und B2 zeigen die Phagenklone PDL25-29MK1 (B1) und PDL 25-29MK2 (B2).

3.3.2 Sequenzanalyse und Charakterisierung

Eine Sequenzierung durch die Firma AplaGen ergab die in Abbildung 17 dargestellten Sequenzen für die relevanten Regionen der identifizierten Klone:

PDL25-29MK1

TTGTGAGCGGATAACAATTGAATTCAGGAGGAATTTAAAATGAAAAAGACAGCTATC
 GCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGT**GGCC**CAGGC**GGCC**CGACTCA
 GCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAGGAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGG
 GGTAGTGGCAGCTACGGCTGGTTCAGCAGAAATCACCTGGCAGTGCCCCTGTAC
 TGTGATCTACTGGAACGACAAGAGACCCTCAAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTC
 CGAGTCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGACGAG
 GCTGTCTATTACTGTGGTGACTACGACGGCAGCAGTAATCCTAGTAGCGGTATATTT
 GGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGTCACTCCTCTAGATCTTCCACCGTGAC
 TTGGACGAGTCCGGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCT
 GCAAGGCCTCCGGGTTCACCTTCAGCGATTATGGCATACTGTGGGTGCGACAGGCG
 CCCGGCAAGGGGCTGGAGTTCGTCGCTGGTATCGGCCATAGTAGCAGAGGTGGTG
 TCAGTACCCCATATTACGGGGCAGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGA
 CGACGGGCAGAGCACAGCGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACC
 GGCACCTACTACTGCACCAGAGCTCCGGGCTATAATTATTGTGGTAATAATTTTGT
 CTGCTGGTGGTATCGACGCATGGGGCCACATGGGGACCGAAGTCATCGTCTCCTCC
 ACTAGT**GGCC**AGGCC**G...**

PDL25-29MK2

TTGTGAGCGGATAACAATTGAATTCAGGAGGAATTTAAAATGAAAAAGACAGCTATC
 GCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGT**GGCC**CAGGC**GGCC**CTGACTC
 AGCCGTCCTCGGTGTCGCAAACCCAGGAGAAACCGTCAATCTCACCTGCTCCGGGA
 GTGACAGCAACTATGGTTACAGCTGGCACCAGCAGAAGTCTCCTGGCAGTGCCCCT
 GTCACCTGATCTATAGCAACGACAAGAGACCCTCGGACATCCCTTCACGATTCTCC
 GGTTCCGCATCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGA
 CGAGGCTGTCTATTTCTGTGGGAGCTGGGATAGCAGCACTGATGCTATATTTGGGG
 CCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGTCACTCCTCTAGATCTTCCACCGTGACGTTG
 GACGAGTCCGGGGGGCGGCCTCCAGACGCCCGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGC
 AAGGCCTCCGGGTTCAGCTTCAGCAGTTACGGCATGAACTGGGTGCGCCAGGCAC
 CCGGCAAGGGGCTCGAATGGGTGCTGGTATCTGTAACACTGGTAGTACCACATTC
 TACGGGTGCGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACAACGGGCAGAGCA
 CAGTGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGCCACCTACTACTGT
 GCCAAAGGTTCTTATGGTGGTTCGATTCTGATGGTAGCATCGACGCATGGGGCCA
 CGGGGACCGAAGTCATCGTCTCCT [...].

Abbildung 17: Ergebnis der Sequenzierung der Klone PDL 25-29MK1 und PDL25-29MK2 durch die Firma Aplan, Baesweiler. Hervorgehoben sind die *Sfi* I-Schnittstellen. Bei PDL25-29MK2 ist die zweite *Sfi* I-Schnittstelle nicht erfasst.

Bei den Sequenzen kennzeichnet die Nukleotidabfolge GGCC die *Sfi* I-Schnittstelle. Das Insert wird von zwei *Sfi* I-Schnittstellen eingefasst. Während bei PDL25-29MK1 beide *Sfi* I-Schnittstellen zu identifizieren sind, ist bei PDL25-29MK2 ist die zweite *Sfi* I-Schnittstelle nicht mehr erfasst (Abbildung 17).

Nach der Sequenzanalyse wurde durch das Web-Tool EMBOSS der EMBL-EBI Internetseite ein Alignment der Sequenzen von PDL25-29MK1 und PDL25-29MK2 durchgeführt (2.2.5.2, Abbildung 18).

1	GGCCCAGGCGGCCC-GACTCAGCCGTCCTCGGTGTCAGCAAACCTGGGAG	49
1		49
50	GAACCGTCAAGATCACCTGCTCCGGGGTAGTGGCAGC-----TAC	90
50	.	96
91	GGCTGGTTCCAGCAGAAATCACCTGGCAGTGCCCCTGTCACTGTGATCTA	140
97	.	146
141	CTGGAACGACAAGAGACCCCTCAAACATCCCTTCACGATTCTCCGGTTCCG	190
147	..	196
191	AGTCCGGCTCCACAGCCACATTAACCATCACTGGGGTCCAAGCCGAGGAC	240
197	..	246
241	GAGGCTGTCTATTACTGTGGTGA-CTACGACGGCAGCAGTAATCCTAGTA	289
247		288
290	GCGGTATATTTGGGGCCGGGACAACCCTGACCGTCCTAGGTCAGTCCTCT	339
289		336
340	AGATCTTCCACCGTGAC-TTGGACGAGTCCGGGGCGGCCTCCAGACGCC	388
337		386
389	CGGAGGAGCGCTCAGCCTCGTCTGCAAGGCCTCCGGGTTACCTTCAGCG	438
387		436
439	ATTATGGCAT--ACTGTGGGTGCGACAGGCGCCCGGCAAGGGGCTGGAGT	486
437	.	484
487	TCGTCGCTGGTATCGGCCATAGTAGCAGAGGTGGTGTCACTACCCCATAT	536
485	..	522
537	TACGGGGCAGCGGTGAAGGGCCGTGCCACCATCTCGAGGGACGACGGGCA	586
523		572
587	GAGCACAGCGAGGCTGCAGCTGAACAACCTCAGGGCTGAGGACACCGGCA	636
573		622
637	CCTACTACTGCACCAGAGCTCCGGGCTATAATTATTGTGTAAT-AATTT	685
623		661
686	TTGTACTGCTGGTGGTATCGACGCATGGGGCCACATGGGGACCGAAGTCA	735
662		704
736	TCGTCTCCTCCACTAGTGGCCAGGCCG	762
705		713

Abbildung 18: Vergleich der Sequenzen von PDL25-29MK1 und PDL25-29MK2 mittels Alignment (erstellt durch das Web-Tool EMBOSS der EMBL-EBI).

Bei PDL25-29MK2 fehlten die letzten 13 Basen bis zur *Sfi* I-Schnittstelle, die ausgegebene Sequenz reichte aber für eine Einschätzung der Homologie. Die beiden Klone glichen sich gemäß dem Alignment zu 88.2% und unterschieden sich demnach deutlich um 17.8%.

Beide Sequenzen wurden über Alignment Search Tools des NCBI und des EMBL-EBI mit Nucleotidsequenzbanken (2.2.5.2) verglichen. Dabei ergaben sich für beide Sequenzen deutliche Homologien (89-96%) mit bekannten Nukleotidsequenzen, die für Hühner-Immunglobuline kodieren.

Die Phagen, die von den Plasmiden der beiden Klone codiert wurden, trugen wie im Phagen-ELISA nachgewiesen, spezifische scFv-Antikörper gegen die ADAM12-Sequenz 2800 (Abbildung 16, Tabelle 28). Sie zeigten außerdem deutliche Homologien mit bekannten Immunglobulinsequenzen vom Huhn.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der ADAM12-Peptidsequenz 2800

Bei der Peptidsequenz 2800 handelt es sich um einen Abschnitt aus dem Disintegrin-Loop von ADAM12. Diese Sequenz war eine der fünf für diese Arbeit ausgesuchten Abschnitte aus dem ADAM12-Proteingerüst (Tabelle 5), die sowohl gemeinsame als auch spezifische Sequenzen für die löslich exprimierte S-Form und die membrangebundene L-Form von ADAM12 einschlossen. In der menschlichen Placenta werden sowohl ADAM12-S und ADAM12-L in gleichem Maße überexprimiert, übernehmen jedoch vermutlich unterschiedliche Rollen (Aghababaei, Perdu et al. 2014). Die in dieser Arbeit detektierten Antikörper zielen auf die Peptidsequenz 2800, die als Teil des Disintegrin-Loop identifiziert und ausgewählt wurde. Sie ist beiden Isoformen von ADAM12 gemeinsam.

Wird diese Peptidsequenz über das Webtool BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) des UniProt Consortiums (www.uniprot.org) (UniProt 2014) mit bekannten Proteinen der Datenbank UniProtKB (UniProt Knowledge Base) verglichen, zeigt sich eine hohe Spezifität der Sequenz 2800 für bekannte ADAM12-Sequenzen aus verschiedenen Spezies. Prinzipiell scheint die Sequenz damit ein geeignetes Target für einen Antikörper gegen ADAM12 zu sein. Dabei umfassen die Spezies neben dem Menschen so phylogenetisch weit voneinander entfernte Arten wie Säugetiere (u. a. Maus, Ratte, Rind und Schimpanse), Vögel (Huhn), Amphibien und Fische. Die Sequenz 2800 ist damit eine bei Wirbeltieren hochkonservierte Peptidsequenz.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die der Sequenz 2800 analogen ADAM12-Sequenzen des Menschen, ausgewählter Säugetiere und des Huhns mittels Alignment über das UniProt-Webtool BLAST verglichen. Dabei ergibt sich eine Übereinstimmung für Mensch, Schimpanse, Pferd, Katze und Hund, während sich die Sequenz bei den Nagetieren (Maus, Ratte, Kaninchen) und auch bei dem Huhn um eine Aminosäure unterscheidet (Tabelle 29).

Es kann durch den Vergleich der in der UniProtKB-Datenbank geführten vollständigen ADAM12-Sequenzen der in Tabelle 29 aufgeführten Spezies durch das

Webtool Clustal Omega der EMBL-EBI Webseite (Sievers, Wilm et al. 2011) ein phylogenetischer Baum konstruiert werden (Abbildung 19).

Tabelle 29 Alignment der Sequenz 2800 aus ADAM12 vom Menschen und anderen Spezies

Sequenz 2800	Spezies
CR D SSNSCDLPEF	Mensch
CR D SSNSCDLPEF	Schimpanse
CR D SSNSCDLPEF	Pferd
CR D SSNSCDLPEF	Katze
CR D SSNSCDLPEF	Hund
CR G SSNSCDLPEF	Maus
CR G SSNSCDLPEF	Kaninchen
CR G SSNSCDLPEF	Ratte
CR E SSNSCDLPEF	Huhn

Über das Alignment mit dem Webtool der Seite des UniProt Consortiums (www.uniprot.org) (UniProt 2014) mit bekannten ADAM12-Sequenzen der Datenbank UniProtKB (UniProt Knowledge Base) lassen sich die der Sequenz 2800 entsprechenden Sequenzen ausgewählter Wirbeltiere miteinander vergleichen. Dabei zeigt sich eine identische Sequenz für die ersten vier Säugetiere und ein Unterschied von jeweils einer Aminosäure zu der Sequenz der Nagetiere und der Sequenz des Huhns.

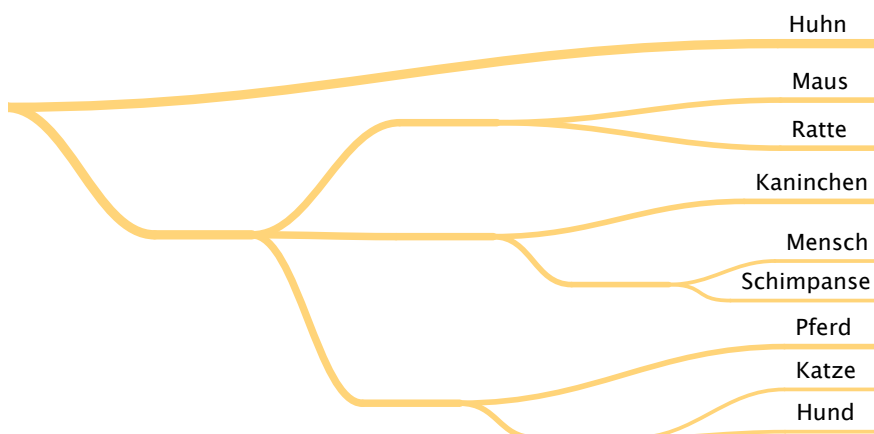


Abbildung 19: Phylogenetischer Baum, der nach dem Alignment der ADAM12-Sequenzen der abgebildeten Tiere aus der UniProtKB-Datenbank mit den Webtool BLAST durch das Webtool Clustal Omega (Webtools der EMBL-EBI Internetseite) (Sievers, Wilm et al. 2011) konstruiert werden kann. Phylogenetisch ist die ADAM12-Peptidsequenz des Huhns am wenigstens mit der des Menschen verwandt.

Die ADAM12-Sequenz des Huhns ist phylogenetisch am weitesten von der des Menschen, aber auch von der anderer verglichener Säugetiere entfernt. Man ist versucht, dies ebenfalls aus der (vergleichsweise kurzen) Peptidsequenz 2800 herauszulesen. Mensch, Schimpanse, Pferd, Katze und Hund haben identische

2800-Sequenzen, während bei den Nagetieren Maus und Ratte und bei Kaninchen an dritter Position Glycin an der Stelle der Asparaginsäure steht (Tabelle 29). Nur das Huhn besitzt an der dritten Position Glutaminsäure als konservativen Austausch der Asparaginsäure.

4.2 Charakterisierung der Antikörper gegen 2800

Der Aufgabenstellung gemäß wurden die zwei Antikörper PDL25-29MK1 und PDL25-29MK2 mittels Phage Display identifiziert. Diese zeigen in einem paarweisen Alignment zu mindestens 88,2% Übereinstimmung (PDL25-29MK2 fehlen die letzten 13 Basenpaare bis zur *Sfi* I-Schnittstelle). In einer unselektionierten Bibliothek liegt nach Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe eine Homologie von 80-90% vor, so dass sich die beiden Phagenklone im Rahmen der erwarteten Varianz unterscheiden. Die Proteinsequenzen beider Antikörper wurden außerdem über Alignment Search Tools (McWilliam, Li et al. 2013) des NCBI und des EMBL-EBI mit Nucleotidsequenzbanken (2.2.5.2) verglichen. Dabei ergaben sich für beide Sequenzen deutliche Homologien (89-96%) mit bekannten Nukleotidsequenzen, die für Hühner-Immunglobuline kodieren.

Damit sind beide Klone plausibel aus der Immunisierung der Hühner hervorgegangen, über das Phage Display gegen ihr spezifisches Antigen selektioniert worden und als Ergebnis dieser Arbeit verwertbar.

Unklar ist, warum nur Antikörper gegen die Sequenz 2800 generiert werden konnten. Dies könnte bereits im ersten Schritt mit einer nur geringen Immunogenität der Peptidsequenzen bei der Hühnerimmunisierung zusammenhängen. Allerdings erbringt ein Abgleich der anderen Sequenzen 2799, 2801, 2802, 2803 mit dem BLAST-Webtool des UniProt Consortiums für diese Sequenzen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während Sequenz 2801 sowohl in den ADAM12-Sequenzen von Huhn und Mensch zu 100% identisch ist, gleichen sich die analogen 2799-Sequenzen nur zu 91%. Die Sequenzen 2802 und 2803 sind im Huhn nicht bekannt. Unterschiede in der Immunogenität lassen sich durch phylogenetische Vergleiche der kurzen Peptidsequenzen nicht schlüssig klären.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Antikörper gegen hochkonservierte Trophoblastenantigene durch die hier eingesetzte Phage Display Technik isoliert werden können. Das Phage Display erlaubt im Gegensatz zur konventionellen Hybridom-Technik eine sehr breite Auswahl an möglichen Immunisierungswirten. Da die Maus als typisches Wirtstier bei der Hybridom-Technik phylogenetisch mit dem Menschen und anderen Placenta-bildenden Säugern verwandt ist, könnte dies Probleme bei der Erkennung und Antikörperbildung gegen hochkonservierte Epitope im Sinne eines phylogenetischen Bias ergeben (Hof, Hoeke et al. 2008). Da jedoch auch in Hühnern ADAM12 zumindest während der embryonalen Entwicklung verschiedener Organe exprimiert wird (Lin, Yan et al. 2010, Lin, Luo et al. 2011), könnte eine Immunreaktion gegen ADAM12-Antigene unterdrückt werden, um Autoimmunreaktionen zu vermeiden. Kommerziell erhältliche Antikörper gegen ADAM12 stammen von Kaninchen, Ziege und Maus. Da die humane ADAM12-Sequenz ein bei Wirbeltieren speziesübergreifend nachgewiesenes Protein (<http://people.virginia.edu/~jw7g/>) ist, bietet sich bei der Immunisierung bezüglich des Wirtes kein besserer Alternativkandidat an, so dass die Wahl des Huhns zur Immunisierung in dieser Arbeit gerechtfertigt bleibt. Speziell für die ausgewählte Zielsequenz 2800 ergibt sich in einem speziesübergreifenden Alignment (Abbildung 19) vom Menschen aus phylogenetisch die größte Entfernung zum Huhn.

Ein weiterer Grund dafür, dass nur Antikörper gegen die Sequenz 2800 generiert werden konnten, könnte in der Struktur von ADAM12 liegen. Die genaue Raumstruktur von ADAM12 ist bis dato nicht vollständig aufgeschlüsselt (Nyren-Erickson, Jones et al. 2013). ADAMs sind jedoch verwandt mit den SVMPs, bei denen der Disintegrin-Loop in der Gesamtproteinstruktur versteckt und nicht frei zugänglich ist (Edwards, Handsley et al. 2008). So wäre eine Peptidsequenz aus dem Disintegrin-Loop möglicherweise immunogener als andere, die in der Raumstruktur frei zugänglich und damit dem Immunsystem des Wirtstiers bekannt sind. Dies könnte der Grund sein, warum gerade die Sequenz 2800 immunogener als die anderen Sequenzen gewesen ist und als einzige in dieser Arbeit zu Antikörpern führte. Diese Betrachtung immunogener Unterschiede kommt auch ohne Homologievergleiche aus und könnte daher ein brauchbarer Ansatz zur Erklärung der in dieser Arbeit beobachteten variablen Immunogenität verschiedener Peptide sein.

4.3 Herstellung der scFv-Antikörper mittels Phage Display

Die Phage Display Technik ermöglicht - im Gegensatz zu konventionellen Hybridom-Technik - die Immunantwort eines großen Spektrums an Tieren zu erfassen und mittels Selektion der polyklonalen Phagenbibliotheken einen spezifischen monoklonalen Antikörper zu generieren (Schmitz, Versmold et al. 2000).

Für diese Arbeit wurde ein in der Arbeitsgruppe etabliertes, modifiziertes Protokoll nach Andris-Widhopf, Rader et al. (2000) mit bereits etablierten Bakterienstämmen und Helferphagen verwendet. Das Protokoll sieht die Fusion des scFv-Antikörpers an das Phagenhüllprotein pIII vor. Während die Polypeptidfusion an allen Hüllproteinen des M13-Phagen möglich ist, haben in der Literatur hauptsächlich das Phage Display mit den Hüllproteinen pIII und an pVIII Einsatz gefunden. Dabei gibt es eine Größenbegrenzung für die Polypeptidfusion an pVIII (Iannolo, Minenkova et al. 1995, Malik, Terry et al. 1996), während pIII größere Peptidfusionen toleriert. Zudem werden nur 1-2 Kopien des Antikörperproteins präsentiert, so dass eher hochaffine Bindungspartner selektiert werden (Kretzschmar und Geiser 1995, Sidhu, Lowman et al. 2000). Wenn pVIII zum Einsatz kommt, werden Phagenpartikel mit mehreren Antikörpern an der Oberfläche produziert, die eher niedrigaffine (jedoch hochavide) Bindungspartner selektieren (Kay, Winter et al. 1996). Für die Zwecke dieser Arbeit waren hochaffine Antikörper gewünscht, so dass schon in der Konzeption keine pVIII-Fusion geplant war.

Im folgenden sollen aufgetretene Probleme, Änderungen und Überlegungen in der praktischen Durchführung des Phage Display Protokolls und dem anschließenden Phagen-ELISA zusammengefasst werden:

Während die Milzverarbeitung und die Transkription der RNA in cDNA problemlos erfolgten, erwies sich die Splice Extension Overlap-PCR als recht fehleranfällig. Verunreinigungen der Vk- und Vh-Ketten führten zu einer verminderten Effizienz der Overlap-PCR. Durch mehrfache Aufreinigung mittels „Freeze Squeeze“ konnte ein brauchbarer Reinheitsgrad erreicht werden. Je nach Konzentration der Vk und Vh und auch der Overlap-PCR-Produkte mussten für optimale PCR-Bedingungen die jeweiligen Konzentrationen angepasst werden, so dass für H25-H29 das Standardprotokoll jeweils ein wenig abgeändert werden musste. In unseren

Laboransätzen zeigte sich analog zu den Beobachtungen von Draghici (2008), dass eine ausgeglichene 1:1-Stöchiometrie der Edukte einzuhalten war, um ausreichende und in den Gelen nachweisbare Overlap-PCR-Produkte zu erhalten.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die hier eingesetzten Methoden ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis erbracht haben, weil

- a) scFv-Antikörper gegen eines der eingesetzten ADAM12 Peptide kloniert und sequenziert werden konnten,
- b) außerdem auch nachgewiesen werden konnte, dass diese Antikörper über die in diesem Projekt eingesetzte Methode aus den immunisierten Hühnern in die rekombinante Bibliothek überführt worden waren,
- c) die Grundmethodik sicherlich noch optimierbar sein wird, wofür in der Durchführung dieses Projektes bereits einige Ansatzpunkte eröffnet werden konnten. Hierauf soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

Allgemeine Problemquellen beim Phage Display im Stadium der Transformation und Expression im Wirtsbakterium ergeben sich gerade aus den Stärken dieser Methode, wie auch bereits in ähnlicher Weise durch Schmitz, Versmold et al. (2000) in ihrer Übersichtsarbeit zusammengefasst wird:

1. Der hohe Durchsatz, der durch den bakteriellen Wirt ermöglicht wird, könnte durch den bakterieneigenen Metabolismus zu Verlusten von gewünschten Antikörpern oder Deletionen/Rekombinationen führen.
2. Es ist sehr schwierig, die eukaryotischen Leseraster, die in den Plasmiden enthalten sind, optimal für das bakterielle System aufzubereiten, so dass einige Klone durch schwache oder fehlende Expression der Sequenz in *E. coli* verloren gehen könnten.
3. Durch die Biologie des filamentösen Phagen M13 wird sichergestellt, dass ein Phage ein Bakterium infiziert. Wenn jedoch Wildtyp filamentöse Phagen oder Helferphagen die Bakterien kontaminieren, gehen ganze Bibliotheken verloren, weil die bereits unspezifisch infizierten Bakterien nicht mehr für die Infektion der gewünschten Phagenpopulation zur Verfügung stehen.

4. Durch eine Infektion der Bakterienstämme durch nicht-filamentöse Phagen kann durch die fortwährend lysierenden Bakterienpopulationen kein brauchbarer Durchsatz erreicht werden.

Neben diesen generellen Punkten, auf die beim Phage Display zu achten ist, ist vor allem das Panning ein möglicher Ansatzpunkt für Optimierungen. In unserer Arbeitsgruppe war das Panning in mit Antigen beschichteten Microtiterplatten die übliche Methode. In der vorliegenden Arbeit wurden die Panning-Schritte jedoch – abweichend vom üblichen Protokoll – mittels beschichteten magnetischen Microbeads durchgeführt. Das Antigen wird dabei über seine Biotinylierung und den sekundären Antikörper auf den Beads ausgerichtet und auf der sphärischen Oberfläche präsentiert. Eine partielle Denaturierung durch ein direktes Coating und die damit verbundene Oberflächenadsorption wird dadurch vermieden. Auf diese Weise sollte eine maximale Ausbeute von bindenden Phagenantikörpern erreicht werden, denn Klone, die einmal verloren gegangen sind, stehen nach einer Panningrunde nicht mehr zur weiteren Selektion zur Verfügung. Eine Variation dieses Protokolls ist eine Prä-Inkubation der Phagenbibliothek mit dem biotinylierten Antigen in freier Lösung. Dies erlaubt dann die Extraktion von Peptid/Phagen-Komplexen durch die Inkubation mit Streptavidin-Beads (Clackson und Lowman 2004). Im Grunde sind dem findigen Experimentator hier keine Grenzen bei der Nutzung von Protein-Protein Interaktionen zur Selektion spezifischer Phagen-Antikörper gesetzt. Dies bedeutet aber auch, dass die Panning-Strategie sehr wahrscheinlich individuell auf einzelne Antigene spezifisch ausgerichtet werden muss. Diese Ausrichtung kann aber nach gegenwärtigem Stand nur empirisch anhand des Selektionserfolges optimiert werden.

Selektiert wurde in dieser Arbeit gegen einen Pool aus den fünf ausgewählten Peptidsequenzen. Das Panning gegen jedes einzelne Peptid hätte möglicherweise bereits zu einer besseren Selektion von hochaffinen Antikörpern geführt. Denkbar wäre auch ein Panning gegen das Gesamtprotein ADAM12 gewesen, besonders in Bezug auf die Möglichkeit einer Anwendung in der Detektion von ADAM12. Gereinigtes bzw. rekombinant exprimiertes humanes ADAM12 stand allerdings bei der Erstellung dieser Dissertation nicht zur Verfügung.

Bei dem Phagen-ELISA im letzten Schritt zur Selektivitätsprüfung wurden Streptavidin-gecoatete Platten verwendet und analog zu den Streptavidin-gecoateten Beads mit biotyniliertem Antigen inkubiert, um nicht durch eine Veränderung der Antigen-Antikörper-Bindungscharakteristik das Ergebnis der Prüfung zu beeinflussen (Hoogenboom 2002). Es ist nach Erfahrung dieser Arbeitsgruppe dabei generell empfehlenswert, im Phagen-ELISA ähnliche Präsentationsbedingungen des Antigens zu benutzen wie im vorausgegangenen Panning.

4.4 Weitere Schritte

Zur Verstärkung der Antikörperaffinität ist eine in vitro Affinitätsmaturation möglich (Daugherty, Chen et al. 2000, Levin und Weiss 2006). Diese beruht auf einem Mutationsverfahren auf DNA-Ebene mit anschließendem Panning, die nach mehreren Runden prinzipiell zu einer Steigerung der Affinität der isolierten Phagenantikörper führt.

Nach Identifizierung eines geeigneten Antikörpers besteht in der Folge die Möglichkeit, den scFv-Antikörper in löslicher Form in großem Maßstab ohne Phagen in *E. coli* zu produzieren. Solche Vektorsysteme, die kommerziell von vielen Quellen zu beziehen sind, verwenden Tags wie den His-Tag (ein Hexapeptid bestehend aus sechs Histidinresten, die verwendet werden können, um den Antikörper über Nickel-Affinitätschromatographie aufzureinigen) oder den HA- oder myc-Tag (beide sind kleine Oligopeptid-Sequenzen, abgeleitet von Hemaggluninin (HA) oder vom myc-Onkogen, die dazu dienen, das rekombinante Molekül mittels Tag-spezifischen Antikörpern zu detektieren), um den rekombinanten Antikörper zu markieren (Schmitz, Versmold et al. 2000).

ADAM12 spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen und pathologischen Vorgängen im menschlichen Körper. Diese Arbeit hat gezeigt, dass eine Generierung von Antikörpern gegen ADAM12 Fragmente mittels Chicken Antibody Phage Display nach dem Aufwand der Verfahrensetablierung technisch möglich ist. Bezüglich einer sinnvollen Zielsequenz zur Detektion von ADAM12 für den klinischen Gebrauch, sei es zur Detektion von ADAM12 oder zur Durchführung von funktionellen Assays, besteht sicher noch weiterer Forschungs- und Optimierungsbedarf.

Konkrete weitere Schritte für die beiden in dieser Arbeit isolierten Phagenantikörper wären die lösliche Expression der beiden scFv-Antikörper in einem geeigneten Expressionssystem und eine nachfolgende Testung der phagenfreien Antikörpermoleküle gegen mittlerweile kommerziell verfügbares rekombinantes humanes ADAM12 (Western Blot, ELISA) zur Evaluation des Anwendungspotentials der Antikörper und der Erreichbarkeit des Ziel-Epitops. Mit löslich exprimierten Antikörpern wäre auch eine Untersuchung an Gewebeschnitten möglich. Diese Erweiterungen – insbesondere die lösliche Expression der Antikörper – waren jedoch nicht Bestandteil der im Kern methodisch orientierten Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit.

5 Zusammenfassung

ADAM12 gehört zu der großen Familie der ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase). Die ADAMs sind multifunktionale Proteine, die durch ihre katalytischen und adhäsiven Eigenschaften und ihrer Anbindung an intrazelluläre Signalkaskaden wichtige zelluläre Funktionen übernehmen. Neben seinen physiologischen Aufgaben im menschlichen Körper spielt ADAM12 in der Pathogenese verschiedener Karzinome und anderer Krankheitszustände eine Rolle.

Die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von ADAM12 sind in der Schwangerschaft und beim Mammakarzinom am intensivsten untersucht, weswegen in diesen Bereichen kurzfristig auch der höchste medizinische Nutzen möglich erscheint. Erhöhte Serum- und Urinkonzentrationen von ADAM12 sind mit der Diagnose, dem Fortschreiten und der Prognose des Mammakarzinoms assoziiert. In der Schwangerschaft weisen veränderte ADAM12-Level auf Unregelmäßigkeiten (Down-Syndrom, Präeklampsie) hin und sind damit potentielle Biomarker für den Schwangerschaftsverlauf.

Die genaue Rolle, die ADAM12 physiologisch während der Schwangerschaft in der Placenta erfüllt, ist noch nicht vollständig geklärt. Dabei zeigten (Aghababaei, Perdu et al. 2014) in einer aktuellen Arbeit, dass ADAM12 in invasiven Trophoblasten lokalisiert und die Zellinvasion und Säulenformierung in der frühen Plazenta fördert. Die negative Assoziation von erniedrigten ADAM12-Levels in Serum und Urin bei Schwangerschaftsunregelmäßigkeiten wäre damit plausibler zu erklären. Der genaue Einfluss von ADAM12 auf die jeweiligen pathophysiologischen Vorgänge muss dafür allerdings noch aufgeklärt werden.

Für die Etablierung standardisierter *in vivo* und *in vitro* Detektionsverfahren für ADAM12 ist ein verlässlicher Antikörper notwendig. Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines ADAM12-Antikörpers mittels Phage Display. Hierzu wurden fünf Hühner mit jeweils einer Peptidsequenz aus unterschiedlichen Regionen von ADAM12 immunisiert, die Immunantwort in eine Phage Display Bibliothek überführt und mittels Panning gegen die ursprünglichen Peptidsequenzen selektiert und angereichert. Es konnten zwei Antikörper gegen die Peptidsequenz 2800 generiert werden. Die Sequenz stammt aus dem Disintegrin-Loop von ADAM12. Eine

praktische z. B. immunhistologische Anwendung der generierten Antikörper ist durch die versteckte Lage des Disintegrin-Loops in der Gesamtproteinstruktur möglicherweise beeinträchtigt.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Generierung eines spezifischen Antikörpers gegen eine ADAM12-Sequenz mittels Chicken Phage Display möglich ist. Der entscheidende Vorteil eines mittels Phage Display gewonnenen Antikörpers ist die Möglichkeit, die Antikörperinformation des spezifisch bindenden Phagenantikörpers mit vergleichsweise wenig Aufwand zu präparieren, in einen geeigneten Expressionsvektor zu überführen und in großen Mengen zu produzieren.

Die in der vorliegenden Arbeit grundlegend erarbeitete Methode kann weiter verfeinert und auch auf andere hochkonservierte Proteine/Epitope des menschlichen Trophoblasten angewandt werden.

6 Literatur

Abe, E., H. Mocharla, T. Yamate, Y. Taguchi and S. C. Manolagas (1999). "Meltrin-alpha, a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation." Calcif Tissue Int **64**(6): 508-515.

Aghababaei, M., S. Perdu, K. Irvine and A. G. Beristain (2014). "A disintegrin and metalloproteinase 12 (ADAM12) localizes to invasive trophoblast, promotes cell invasion and directs column outgrowth in early placental development." Mol Hum Reprod **20**(3): 235-249.

Andris-Widhopf, J., C. Rader, P. Steinberger, R. Fuller and C. F. Barbas, 3rd (2000). "Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display." J Immunol Methods **242**(1-2): 159-181.

Barbas, C. F., 3rd, A. S. Kang, R. A. Lerner and S. J. Benkovic (1991). "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(18): 7978-7982.

Blobel, C. P. (1997). "Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch." Cell **90**(4): 589-592.

Blobel, C. P. (2005). "ADAMs: key components in EGFR signalling and development." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 32-43.

Bourd-Boittin, K., H. Le Pabic, D. Bonnier, A. L'Helgoualc'h and N. Theret (2008). "RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis." J Biol Chem **283**(38): 26000-26009.

Boyd, J. D. and W. J. Hamilton (1970). The Human Placenta, Macmillan.

Christiansen, M., K. Pihl, P. L. Hedley, A. C. Gjerris, P. O. Lind, S. O. Larsen, L. Krebs and T. Larsen (2010). "ADAM 12 may be used to reduce the false positive rate of first trimester combined screening for Down syndrome." Prenat Diagn **30**(2): 110-114.

Christiansen, M., K. Spencer, J. Laigaard, N. J. Cowans, S. O. Larsen and U. M. Wewer (2007). "ADAM 12 as a second-trimester maternal serum marker in screening for Down syndrome." Prenat Diagn **27**(7): 611-615.

Clackson, T., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths and G. Winter (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries." Nature **352**(6336): 624-628.

Clackson, T. and H. B. Lowman (2004). Phage Display : A Practical Approach: A Practical Approach, OUP Oxford.

Daugherty, P. S., G. Chen, B. L. Iverson and G. Georgiou (2000). "Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2029-2034.

Draghici, A. B. (2008). Sind Antikörper gegen fusionsrelevante HIV-Fragmente mittels Phage Display generierbar?, Sierke.

Duffy, M. J., E. McKiernan, N. O'Donovan and P. M. McGowan (2009). "Role of ADAMs in cancer formation and progression." Clin Cancer Res **15**(4): 1140-1144.

Edwards, D. R., M. M. Handsley and C. J. Pennington (2008). "The ADAM metalloproteinases." Mol Aspects Med **29**(5): 258-289.

Estrella, C., N. Rocks, G. Paulissen, F. Quesada-Calvo, A. Noel, E. Vilain, P. Lassalle, I. Tillie-Leblond, D. Cataldo and P. Gosset (2009). "Role of A disintegrin and metalloprotease-12 in neutrophil recruitment induced by airway epithelium." Am J Respir Cell Mol Biol **41**(4): 449-458.

Frohlich, C., R. Albrechtsen, L. Dyrskjot, L. Rudkjaer, T. F. Orntoft and U. M. Wewer (2006). "Molecular profiling of ADAM12 in human bladder cancer." Clin Cancer Res **12**(24): 7359-7368.

Frohlich, C., C. Nehammer, R. Albrechtsen, P. Kronqvist, M. Kveiborg, A. Sehara-Fujisawa, A. M. Mercurio and U. M. Wewer (2011). "ADAM12 produced by tumor cells rather than stromal cells accelerates breast tumor progression." Mol Cancer Res **9**(11): 1449-1461.

Gilpin, B. J., F. Loechel, M. G. Mattei, E. Engvall, R. Albrechtsen and U. M. Wewer (1998). "A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo." J Biol Chem **273**(1): 157-166.

Goueli, S. A., J. Hanten, A. Davis and K. Ahmed (1990). "Polyclonal antibodies against rat liver cytosolic casein kinase II (CK-2) cross-react with CK-2 from other tissues and nuclear form (PK-N2) of the enzyme." Biochem Int **21**(4): 685-694.

Guglin, M., R. Cutro and J. D. Mishkin (2008). "Trastuzumab-induced cardiomyopathy." J Card Fail **14**(5): 437-444.

Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura and P. Saftig (2002). "The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts." Hum Mol Genet **11**(21): 2615-2624.

Higashiyama, S. and D. Nanba (2005). "ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk." Biochim Biophys Acta **1751**(1): 110-117.

Hof, D., M. O. Hoeke and J. M. Raats (2008). "Multiple-antigen immunization of chickens facilitates the generation of recombinant antibodies to autoantigens." Clin Exp Immunol **151**(2): 367-377.

Hoogenboom, H. R. (2002). "Overview of antibody phage-display technology and its applications." Methods Mol Biol **178**: 1-37.

- Iannolo, G., O. Minenkova, R. Petruzzelli and G. Cesareni (1995). "Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein." J Mol Biol **248**(4): 835-844.
- Iba, K., R. Albrechtsen, B. J. Gilpin, F. Loechel and U. M. Wewer (1999). "Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion." Am J Pathol **154**(5): 1489-1501.
- Jacobsen, J. and U. M. Wewer (2009). "Targeting ADAM12 in human disease: head, body or tail?" Curr Pharm Des **15**(20): 2300-2310.
- Janes, P. W., N. Saha, W. A. Barton, M. V. Koley, S. H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C. P. Blobel, J. P. Himanen, M. Lackmann and D. B. Nikolov (2005). "Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans." Cell **123**(2): 291-304.
- Johnson, M., I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezuk, S. McGinnis and T. L. Madden (2008). "NCBI BLAST: a better web interface." Nucleic Acids Res **36**(Web Server issue): W5-9.
- Kay, B. K., J. Winter and J. McCafferty (1996). Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Elsevier Science.
- Klement, G. L., D. Goukassian, L. Hlatky, J. Carrozza, J. P. Morgan and X. Yan (2012). "Cancer Therapy Targeting the HER2-PI3K Pathway: Potential Impact on the Heart." Front Pharmacol **3**: 113.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-497.
- Kokozidou, M., S. Drewlo, C. Bartz, G. Raven, L. O. Brandenburg, C. J. Wruck and T. Pufe (2011). "Complex patterns of ADAM12 mRNA and protein splice variants in the human placenta." Ann Anat **193**(2): 142-148.
- Kretzschmar, T. and M. Geiser (1995). "Evaluation of antibodies fused to minor coat protein III and major coat protein VIII of bacteriophage M13." Gene **155**(1): 61-65.
- Laigaard, J., K. Spencer, M. Christiansen, N. J. Cowans, S. O. Larsen, B. N. Pedersen and U. M. Wewer (2006). "ADAM 12 as a first-trimester maternal serum marker in screening for Down syndrome." Prenat Diagn **26**(10): 973-979.
- Levin, A. M. and G. A. Weiss (2006). "Optimizing the affinity and specificity of proteins with molecular display." Mol Biosyst **2**(1): 49-57.
- Li, H., S. Duhachek-Muggy, Y. Qi, Y. Hong, F. Behbod and A. Zolkiewska (2012). "An essential role of metalloprotease-disintegrin ADAM12 in triple-negative breast cancer." Breast Cancer Res Treat **135**(3): 759-769.
- Lin, J., J. Luo and C. Redies (2011). "Differential regional expression of multiple ADAMs during feather bud formation." Dev Dyn **240**(9): 2142-2152.

Lin, J., X. Yan, A. Markus, C. Redies, A. Rolfs and J. Luo (2010). "Expression of seven members of the ADAM family in developing chicken spinal cord." Dev Dyn **239**(4): 1246-1254.

Loechel, F., B. J. Gilpin, E. Engvall, R. Albrechtsen and U. M. Wewer (1998). "Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease." J Biol Chem **273**(27): 16993-16997.

Malik, P., T. D. Terry, L. R. Gowda, A. Langara, S. A. Petukhov, M. F. Symmons, L. C. Welsh, D. A. Marvin and R. N. Perham (1996). "Role of capsid structure and membrane protein processing in determining the size and copy number of peptides displayed on the major coat protein of filamentous bacteriophage." J Mol Biol **260**(1): 9-21.

McCafferty, J., K. J. Fitzgerald, J. Earnshaw, D. J. Chiswell, J. Link, R. Smith and J. Kenten (1994). "Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display." Appl Biochem Biotechnol **47**(2-3): 157-171; discussion 171-153.

McCafferty, J., A. D. Griffiths, G. Winter and D. J. Chiswell (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." Nature **348**(6301): 552-554.

McWilliam, H., W. Li, M. Uludag, S. Squizzato, Y. M. Park, N. Buso, A. P. Cowley and R. Lopez (2013). "Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI." Nucleic Acids Res **41**(Web Server issue): W597-600.

Mino, N., R. Miyahara, E. Nakayama, T. Takahashi, A. Takahashi, S. Iwakiri, M. Sonobe, K. Okubo, T. Hirata, A. Sehara and H. Date (2009). "A disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) is a prognostic factor in resected pathological stage I lung adenocarcinoma." J Surg Oncol **100**(3): 267-272.

Narita, D., E. Seclaman, S. Ursoniu and A. Anghel (2012). "Increased expression of ADAM12 and ADAM17 genes in laser-capture microdissected breast cancers and correlations with clinical and pathological characteristics." Acta Histochem **114**(2): 131-139.

Nyren-Erickson, E. K., J. M. Jones, D. K. Srivastava and S. Mallik (2013). "A disintegrin and metalloproteinase-12 (ADAM12): function, roles in disease progression, and clinical implications." Biochim Biophys Acta **1830**(10): 4445-4455.

Olayioye, M. A. (2001). "Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members." Breast Cancer Res **3**(6): 385-389.

Poon, L. C., T. Chelemen, R. Minekawa, V. Frisova and K. H. Nicolaides (2009). "Maternal serum ADAM12 (A disintegrin and metalloprotease) in chromosomally abnormal pregnancy at 11-13 weeks." Am J Obstet Gynecol **200**(5): 508 e501-506.

Potgens, A. J., U. Schmitz, P. Bose, A. Versmold, P. Kaufmann and H. G. Frank (2002). "Mechanisms of syncytial fusion: a review." Placenta **23 Suppl A**: S107-113.

Ray, B. K., S. Dhar, A. Shakya and A. Ray (2011). "Z-DNA-forming silencer in the first exon regulates human ADAM-12 gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(1): 103-108.

Reiss, K. and P. Saftig (2009). "The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions." Semin Cell Dev Biol **20**(2): 126-137.

Rice, P., I. Longden and A. Bleasby (2000). "EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite." Trends Genet **16**(6): 276-277.

Rocks, N., C. Estrella, G. Paulissen, F. Quesada-Calvo, C. Gilles, M. M. Gueders, C. Crahay, J. M. Foidart, P. Gosset, A. Noel and D. D. Cataldo (2008). "The metalloproteinase ADAM-12 regulates bronchial epithelial cell proliferation and apoptosis." Cell Prolif **41**(6): 988-1001.

Rocks, N., G. Paulissen, F. Quesada Calvo, M. Polette, M. Gueders, C. Munaut, J. M. Foidart, A. Noel, P. Birembaut and D. Cataldo (2006). "Expression of a disintegrin and metalloprotease (ADAM and ADAMTS) enzymes in human non-small-cell lung carcinomas (NSCLC)." Br J Cancer **94**(5): 724-730.

Roy, R. and M. A. Moses (2012). "ADAM12 induces estrogen-independence in breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **131**(3): 731-741.

Roy, R., U. M. Wewer, D. Zurakowski, S. E. Pories and M. A. Moses (2004). "ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage." J Biol Chem **279**(49): 51323-51330.

Roy, R., J. Yang and M. A. Moses (2009). "Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer." J Clin Oncol **27**(31): 5287-5297.

Schmitz, U., A. Versmold, P. Kaufmann and H. G. Frank (2000). "Phage display: a molecular tool for the generation of antibodies--a review." Placenta **21 Suppl A**: S106-112.

Sheets, M. D., P. Amersdorfer, R. Finnern, P. Sargent, E. Lindquist, R. Schier, G. Hemingsen, C. Wong, J. C. Gerhart and J. D. Marks (1998). "Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6157-6162.

Sidhu, S. S., H. B. Lowman, B. C. Cunningham and J. A. Wells (2000). "Phage display for selection of novel binding peptides." Methods Enzymol **328**: 333-363.

Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson and D. G. Higgins (2011). "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega." Mol Syst Biol **7**: 539.

Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." Science **228**(4705): 1315-1317.

Song, C. S., J. H. Yu, D. H. Bai, P. Y. Hester and K. H. Kim (1985). "Antibodies to the alpha-subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens." J Immunol **135**(5): 3354-3359.

Tautz, D. and M. Renz (1983). "An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels." Anal Biochem **132**(1): 14-19.

UniProt, C. (2014). "Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D191-198.

Vieira, J. and J. Messing (1987). "Production of single-stranded plasmid DNA." Methods Enzymol **153**: 3-11.

Wang, M., S. Lu, Y. Zhu and H. Li (2010). "ADAM12 is an effective marker in the second trimester of pregnancy for prenatal screening of Down syndrome." Prenat Diagn **30**(6): 561-564.

Wang, X., F. L. Chow, T. Oka, L. Hao, A. Lopez-Campistrous, S. Kelly, S. Cooper, J. Odenbach, B. A. Finegan, R. Schulz, Z. Kassiri, G. D. Lopaschuk and C. Fernandez-Patron (2009). "Matrix metalloproteinase-7 and ADAM-12 (a disintegrin and metalloproteinase-12) define a signaling axis in agonist-induced hypertension and cardiac hypertrophy." Circulation **119**(18): 2480-2489.

Wewer, U. M., M. Morgelin, P. Holck, J. Jacobsen, M. C. Lydolph, A. H. Johnsen, M. Kveiborg and R. Albrechtsen (2006). "ADAM12 is a four-leafed clover: the excised prodomain remains bound to the mature enzyme." J Biol Chem **281**(14): 9418-9422.

Yagami-Hiromasa, T., T. Sato, T. Kurisaki, K. Kamijo, Y. Nabeshima and A. Fujisawa-Sehara (1995). "A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion." Nature **377**(6550): 652-656.

Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-137.

7 Abkürzungsverzeichnis

Einheiten des internationalen Einheitensystems (Système international d'unités, SI), Formeln chemischer Verbindungen und Eigennamen sind nicht aufgelistet.

A	Absorption
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
Amp	Ampicillin
AMV	avian myeloblastosis virus
AZ	Aktenzeichen
BLAST	basic local alignment search tool
Bp	base pair, Basenpaar
BSA	bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
cDNA	complementary, komplementäre DNA
cfu	colony forming unit, Kolonie-bildende Einheit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonuclein acid, Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
g	Erdbeschleunigung (ca. $9,81 \text{ ms}^{-2}$)
GF RTK	growth factor receptor tyrosine kinase
Her2	human epidermal growth factor receptor 2
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
IGF-1R	insulin like growth factor 1 receptor
kBp	kilo base pairs, 1000 Basenpaare
Kan	Kanamycin
LB	Luria broth
M	Mol/molar
MAPK	mitogen activated proteine kinase
MP	Milchpulver
mRNA	messenger RNA, Boten-Ribonukleinsäure
OPD	o-Phenylenediamine dihydrochloride
p.A.	pro analysi
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit Tween 20
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDL	phage display library, Phagenbibliothek
PEG	Polyethylenglycol
pfu	plaque forming unit, Plaque bildende Einheiten
pelB	bakterielles Leader-Peptid zur periplasmatischen Expression
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RP	Regierungspräsidium
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute

RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
scFv	single chain variable fragment
<i>Sfi</i>	<i>Streptomyces fimbriatus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SVMP	snake venom metalloproteinase
TACE	TNF α convertase
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA
TNF α	tumor necrosis factor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	unit, Einheit
UV	ultraviolett
Vk	variable Region der leichten Antikörperkette
Vh	variable Region der schweren Antikörperkette
YT	Yeast Trypton

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Herstellung von Antikörpern gegen ADAM12 mittels Chicken Antibody Phage Display

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, 06.04.2015

Johann Ahn